

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

WIP media la función oncogénica de p53 mutante



Tesis Doctoral

M^a Isabel Escoll Guerrero

Madrid, 2015



Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM)
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

WIP media la función oncogénica de p53 mutante

Memoria de investigación presentada por

M^a Isabel Escoll Guerrero

para obtener el título de
Doctor en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo codirigido por: Dr. Francisco Wandosell Jurado
Dr. Ricardo A. Gargini.

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor Francisco Wandosell Jurado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Desde Enero del 2010 hasta Agosto del 2010 ha sido financiado con un contrato de la red CIBERNED (ISCIII). Desde Septiembre del 2010 hasta Agosto del 2014 con una beca/contrato FPI del CSIC asociada al proyecto GDYCII ref. SAF-2012-39148-C03-01.

“Las ciencias tienen raíces
amargas pero muy dulces
los frutos”

Aristóteles

Esta tesis va dedicada a mi familia:

A mi Padre y a mis hermanos, Nacho y Pedro.

Pero en especial, quería dedicar esta tesis a mi Madre por todo su apoyo y dedicación, por enseñarme la verdadera lucha contra el cáncer y ser un referente en mi vida como persona y como mujer.

Agradecimientos

Y ahora tan cerca de la meta...

En primer lugar, quiero agradecer a Paco que me diese la posibilidad de trabajar en su laboratorio hace ya... ni sé la tira de años... y darme la gran oportunidad de trabajar en ciencia. Gracias por todas tus enseñanzas, por todas las discusiones científicas, por apoyarme en las decisiones difíciles, darme libertad en el proyecto, confiar e implicarte en él y darle ese toque tuyo que lo hace mejorar. Gracias Paco, has sido un gran jefe!

En segundo lugar quería dar las gracias a Ricardo, gracias por confiar en mi desde el primer instante y aceptar embarcarte en la dirección de esta tesis sin bajarte del tren en un solo momento. Por guiarme con todas tus ideas inagotables y enseñarme todas las técnicas y conocimientos para poder llevar a cabo esta tesis en tiempo record. Gracias por tu positivismo en el día a día, sin ti esto hubiera sido muy difícil...

Mi día a día no hubiera sido lo mismo sin ti Nuria, sin esos ratitos a la hora de comer, esos despejes de cabeza hablando de cosas normales, hemos compartido muchas horas las dos solas, nos hemos echado unas risas, pero sobre todo me has hecho sentir muy bien, apoyándome en mis momentos más difíciles. Eres una gran amiga, gracias Nuria!!! También quería darle las gracias a nuestra nómada Laura, se te echa mucho de menos... Sin duda las comidas sin ti son más silenciosas y con menos esdrújulas, gracias por ayudarme a organizar ideas y resaltarle siempre mi mejora como científica, me das fuerza!!

También quería darle las gracias a Inés, por aguantar esas presentaciones eternas, apoyar y confiar en esta parte del trabajo que une a p53 con tu WIP.

También agradecer a toda la gente que ha compartido conmigo este espacio el laboratorio 206, mi segundo hogar. En primer lugar a Olga y a Héctor, por acogerme y enseñarme mis primeros pasos en el laboratorio. Gracias a Nuria Peralta por enseñarme de forma tan humilde tantas técnicas y darme la confianza de preguntarle cualquier cosa de uso del laboratorio, da gusto la gente como tu! También agradecer a los 'Peques' Laura y Sergio la oportunidad que me dieron de ser su 'profe' y tantos buenos momentos que nos hicieron pasar... ummmm que tartas tan ricas hacían y que chuches, fueron tiempos felices, jiji. También quería dar las gracias a Jonay, M^a José B, M^a José P, Lara O, Lara R, Irene, Marta, Jorge, Laura, José el canario, Ivan... y a Pilar que siempre nos transmite mucha alegría. Y a la gente del CBM y del 208 por todas esas palabras de aliento (Fons, Raquel, Vega, Alberto...)

Por supuesto no me puedo olvidar de Juanjo y sus chicas, Mónica, Diana y Ana, con las que he compartido muy buenos momentos. Gracias por tenerme paciencia y enseñarme esos maravillosos cultivos de neuronas. No sabéis lo que os he echado de

menos en este último tiempo... Y como no, gracias Noe por tu apoyo y por toda la ayuda con el papeleo... Mucha suerte Noe! que vamos a ser doctoras!!!

También quería agradecer a Marta, Cuevas, Garci y a Javi que, aunque no hayan compartido conmigo estos últimos dos años, hemos compartido muy buenos momentos y me han apoyado y escuchado infinitos monólogos sobre mi trabajo, sobre los estrógenos y todos mis problemas con sus receptores y eso es de agradecer...

Gracias a la gente del máster (esos biofísicooooos!!) y a todos esos 'biolocos' de la carrera: Willy, Bruno, Lore, Larilla, Jaime, Cris, Ana C, Ana L, Kitos, Carol, Palulu, Djordje, Ainhoa, Paloma, Paulas, Jero, Piñero, Gon, Rusa, Rincho, Laura, Hugo, Marta, Mariferni, LaHuete... con los que he friqueado de todo tipo de vida, de la biología y la ciencia en general. Y a Almudena y Silvia, con las que empecé a descubrir el maravilloso mundo entre p53 *wild type* y mutante!!!

También quería dar las gracias a mis amigas, que me han aguantado y hecho reír. A Paula, Viky, Isita y Olga con las que he compartido mi vida, muchas cenas y charlas en este tiempo de aislamiento experimental, que me han ayudado a despejar la cabeza y ver que hay vida más allá de las cuatro paredes del labo. Gracias por ayudarme y estar a mi lado siempre, en mis malos momentos y en los buenos. Saber que os tengo ahí, me da tranquilidad. Os quiero guapas!!!

También quería dar las gracias a mis Primas, Primos y a mi Tía Juli, por vuestra preocupación constante y todo vuestro cariño.

Y por último quería dar las gracias a mi familia, empezando por mi hermano Pedro, quien me enseñó hace ya tanto tiempo lo apasionante de la biología. Si no hubiera sido por ti, me dedicaría a otra cosa... y nunca me hubiera exigido tanto. Así que gracias Pedri, por la parte que te toca (que no es poca...) y por supuesto por ese apoyo y correcciones de última hora. También quería agradecer a mi hermano Nacho esa felicidad que me da. Gracias por todas esas llamadas de humor absurdo que me hacen volver al labo con una sonrisa de oreja a oreja. Nachito, eres único!!! Sois los mejores hermanos que se pueden tener!!! y por supuesto también quería darles las gracias a Mónica y a Mer por todo vuestro cariño.

Y ya para terminar quería dar un gran GRACIAS a mis Padres, los mejores. Por todo lo que han hecho en mi vida, sin ellos no estaría ni sería quien soy. Pero sobre todo quería daros las gracias por hacerme siempre fácil el día a día (es algo que valoro infinito de vosotros, esa capacidad que tenéis...). Por ayudarme a que me estrese lo menos posible, por vuestra paciencia... POR CUIDARME, sois los mejores Padres/compañeros de piso que he podido tener!!! Os quiero tanto!!!!

Índice

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	7
SUMMARY/RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN.....	17
I. <u>Características generales del cáncer</u>	19
1. Mantener las señales de proliferación y supervivencia.....	20
1.1 AKT: mantenimiento de las señales de supervivencia y plasticidad celular...20	
1.1.1. Mutaciones frecuentes en el cáncer en la vía PI3K/AKT22	
1.1.2. Isoformas de AKT e implicación con el cáncer.....23	
2. Suprimir los mecanismos que evitan el crecimiento celular.....	24
3. Resistir la muerte celular programada.....	24
3.1 p53: un nombre, dos funciones.....	25
3.1.1. p53 <i>wild type</i> : Supresor tumoral.....	26
3.1.2. p53 mutante: Oncogén.....	27
3.1.3. p53 mutante: Ganancia de funciones.....	28
4. Favorecer la inmortalidad replicativa.....	31
5. Inducir la angiogénesis.....	32
6. Activar mecanismos de invasión y metástasis: <i>cancer stem cell</i> (CSC) y transición epitelio-mesénquima (EMT).....	32
6.1. Vía de HIPPO.....	35
6.1.1. Regulación de YAPT/TAZ por la vía de Wnt.....	37
6.2. Papel del citoesqueleto en la transformación tumoral.....	37
6.2.1. <i>WASP Interacting Protein</i> : WIP.....	38
II. <u>Sistema modelo. Tumores cerebrales: Gliomas</u>	39
1. Glioblastomas multiformes.....	40
1.1. Mutaciones más frecuentes en GB.....	41
OBJETIVOS.....	43
MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
1. Cultivos celulares.....	49
2. Medios de cultivos.....	50
2.1. DMEM 10% suero.....	50
2.2. Medio HS.....	50
2.3. CSC-B27.....	50
2.4. CSC-N2.....	51
3. Plásmidos.....	51
4. Generación de Lentivirus.....	53
5. Generación de Retrovirus.....	53
6. Infección de células.....	53

6.1. Infección en líneas celulares.....	53
6.2. Infección en GBs.....	53
7. Tratamientos farmacológicos.....	54
8. Formación y conteo de esferas secundarias.....	54
9. Conteo de número de células.....	55
10. Viabilidad celular por MTT.....	55
11. Formación de colonias en agar blando.....	55
12. Formación de estructuras invasivas.....	56
13. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (<i>western-blot</i>).....	57
14. Inmunofluorescencia.....	59
15. Citometría de flujo.....	60
15.1. Determinación de muerte celular mediante Citometría de Flujo (Annexin V-FITC/7-AAD).....	60
15.2. Análisis de células con fenotipo <i>stem</i> mediante expresión de CD113.....	60
15.3. Análisis de células con fenotipo <i>stem</i> mediante expresión de CD44 o CD24 ⁻ /CD44 ⁺	61
15.4. Análisis de la expresión de integrina $\alpha 6$	61
16. Obtención de RNAs, realización de RT-qPCR y secuenciación.....	61
17. Inducción de tumores en modelo de ratón inmunodeficiente.....	62
18. Tratamiento estadísticos de los datos.....	62
RESULTADOS	63
1. Efecto de p53 mutante sobre supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC	65
1.1. Caracterización del estado de p53 y su posible correlación con la actividad de AKT en linaje glial.....	65
1.2. p53 mutante y su respuesta al daño en el DNA.....	66
1.3. Análisis de la supervivencia y proliferación de líneas tumorales que expresan p53 mutante endógeno.....	67
1.4. Papel de p53 mutante en líneas tumorales: supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.....	69
1.5. p53 mutante es esencial para el mantenimiento de la vía PI3K-AKT-FoxO-BIM.....	71
1.6. Análisis de la función p53 mutante en GBs: supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.....	74
1.7. Análisis de la función de mutantes concretos de p53 en supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.....	77
2. Efecto de las mutaciones de p53. Elementos regulados por la transformación.....	80

2.1. Análisis de marcadores que correlacionan con la transformación mediada por p53.....	80
2.2. Correlación entre p53 mutante y WIP.....	81
3. Mecanismos por los cuales p53 mutante y WIP llevan a cabo su función oncogénica.....	84
3.1. p53 mutante y WIP controlan el fenotipo tumoral a través de YAP/TAZ.....	84
3.2. Análisis de la regulación de p53 mutante sobre WIP y TAZ.....	87
3.2.1. Análisis del control transcripcional de p53 sobre WIP y TAZ.....	87
3.2.2. p53 mutante y WIP controlan la vida media de TAZ a través de degradación mediada por proteosoma.....	88
3.3. YAP/TAZ son esenciales para mantener la capacidad oncogénica de p53 mutante.....	89
3.4. p53 mutante y WIP controlan el tránsito nuclear de YAP/TAZ.....	91
4. Análisis de la regulación de YAP/TAZ a través de p53 mutante y la ruta del mevalonato.....	93
5. p53 mutante y WIP son necesarios para la capacidad invasiva de GBs.....	96
6. Cooperatividad entre p53 mutante con WIP y YAP/TAZ.....	97
6.1. Cooperatividad entre p53 mutante y WIP.....	97
6.2. Cooperatividad entre p53 mutante y YAP.....	99
7. Mecanismo de regulación entre p53 mutante y WIP.....	101
7.1. Regulación entre p63 y WIP.....	101
7.2. p53 mutante regula a WIP a través de receptores de membrana EGFR/integrinas.....	102
7.3. Regulación entre AKT y WIP.....	105
DISCUSIÓN.....	113
1. p53 mutante y el aumento en la supervivencia.....	115
1.1. p53 mutante incrementa la señalización de PI3K/AKT.....	116
1.2. p53 mutante genera supervivencia independiente de anclaje al inhibir BIM.....	117
1.3. Importancia de p53 mutante: resistencia a quimioterapia.....	119
2. p53 mutante regula a WIP a través de p63 y de los receptores de superficie.....	120
3. WIP media la estabilización de YAP/TAZ.....	124
3.1. p53 y la ruta del mevalonato.....	127
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFÍA.....	133
ANEXO.....	147

Abreviaturas y Acrónimos

3D: 3 dimensiones

Actina-F: Filamentos de actina

Actina-G: Actina globular

AKT: Homólogo del proto-oncogén del virus murino AKT8

ATM: Quinasa mutada en ataxia-telangiectasia (*Ataxia Telangiectasia Mutated kinase*)

ATR: *Ataxia telangiectasia and rad3 related*

Arp2/3: *Actin-related proteins 2 and 3*

BAX: Proteína X asociada a Bcl2 (*Bcl2-associated X protein*)

C-terminal: Carboxi terminal

Cdc42: *Cell division cycle42*

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase*)

CMV: Promotor de citomegalovirus

CSC: *Cancer stem cell*

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo (*Connective tissue growth factor*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DBD: Dominio de unión a ADN (*DNA-binding domain*)

DMEM: MEM modificado por Dulbeco

DMSO: Dimetilsulfóxido (*dimethyl sulfoxide*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNA-PK: Proteína quinasa dependiente de DNA (*DNA-dependent Protein Kinase*)

E-cad: E-cadherina (*Epithelial-cadherin*)

EDTA: Ácido Etildiaminetetracético (*Ethylenediaminetetracetic acid*)

EGTA: Ácido Etilenglicoltetracético (*Ethylenglycoltetracetic*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*)

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*)

EMT: Transición epitelio-mesénquima (*Epithelial to mesenchymal transition*)

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular-signal Regulated Kinase*)

ESR1: *Estrogen receptor 1*

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

GB: Glioblastoma

GBM: Glioblastoma multiforme

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

GEF-H1: *Guanine Nucleotide Exchange Factor H1*

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4 (*Glucose Transporter type 4*)

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G (*G-protein-coupled receptor*)

GSK-3: Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*)

GTPasa: Proteína hidrolizadota de guanosina trifosfato (*Guanosin Triphosphate*)

FoxO: Proteína O con dominio *forkhead box* de unión a DNA (*Forkhead box protein O*)

HEPES: *N*-(2-hydroxyetil)-piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)

HS: Suero de caballo (*Horse Serum*)

ITS: Insulina Transferrina Selenio

kDa: Kilo Dalton

LB: Medio de cultivo lisogénico (*Lysogenic Broth*)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

MDM2: Doble minuto de ratón 2 (*Murine double minute 2*)

MEC: Matriz extracelular

MET: Transición mesénquima-epitelio (*Mesenchymal to epithelial transition*)

MGMT O6: *Methylguanine DNA-methyltransferase*

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (*Messenger ribonucleic acid*)

MRTF-SRF: *Myocardin-related transcription factor (MRTF)*–*serum response factor (SRF)*

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

mTOR: Diana de mamíferos de la rapamicina (*Mammalian Target Of Rapamycin*)

MuLV: *Murine Leukemia Virus*

Nck: *Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein*

NT: Tejido sano (*Normal Tissue*)

N-terminal: Amino Terminal

N-WASP: *Neural-WASP*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate saline buffer*)

PFA: Paraformaldehyde

PGT: PBS, gelatina, Triton-X

PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP₃: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PI3K: Fosfoinosítido 3-quinasa (*Phosphoinositide 3-Kinase*)

PH: Dominio de homología de *Pleckstrina* (*Pleckstrin Homology*)

PM: Peso Molecular

PUMA: *p53 upregulated modulator of apoptosis*

PRAS40: Sustrato de AKT rico en prolina de 40kDa (*Proline Rich Akt Substrate 40 kDa protein*)

PRD: Dominio rico en prolina

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina (*Phosphatase and tensin homolog*)

Raf: Productos proteicos de los proto-oncogenes RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

Ras: Proteína de sarcoma de rata (*Rat sarcoma*)

Rb: Retinoblastoma

RCP: Proteína acoplada a Rab (*Rab-coupling protein*)

RhoA: *Ras homolog gene family A*

rpm: Revoluciones por minuto

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa cuantitativa (*Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*)

SEM: Error estándar de la media (*Standard error of the mean*)

SD: Desviación estándar (*Standard deviation*)

SDS: Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

shRNA: RNA de horquilla corta (*Short hairpin RNA*)

Src: Proteína producto del proto-oncogén de sarcoma

TA: Dominio de transactivación

Tet: Dominio de tetramerización

TICs: Células iniciadoras del tumor (*Cells initiating tumor*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor receptor*)

VSV: Virus de la estomatitis vesicular (*Vesicular stomatitis virus*)

WAS: *Wiskott-Aldrich syndrome*

WASP: *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

WICH/WIRE: *WIP-CR16 homologous/WIP-related*

WIP: *WASP-interacting protein*

WB: *Western Blot*

WT: *Wild type*

YAP: *Yes-associated protein*

Summary/Resumen

Cancer genetics has been profoundly studied from the last 50 years, showing that p53 is mutated in many types of human tumors. On the contrary to what is generally believed, p53 mutations cause not only the loss of its tumor suppression function, but also they lead to an accumulation of the mutated protein and the generation of a new aberrant function, currently known as oncogenic gain-of-function. This gain-of-function seems to favor the acquisition of more aggressive tumoral phenotypes and is associated to a poor prognosis.

Our work demonstrates a key role of the oncogenic gain-of-function of mutated p53 based on the maintenance of the cancer stem cells (CSCs), linking p53 gain-of-function to a higher tumor malignancy. In the present study, we have identified some of the essential components in the mechanism of action of several p53 mutants.

We have observed that WIP, an actin-associated protein, is increased through the oncogenic gain-of-function of mutated p53 and this increment leads to the stabilization of YAP/TAZ and its subsequent nuclear translocation, favoring the maintenance and growth of the CSC/mesenchymal phenotype and the invasive capacity of the tumor.

The signaling and recycling of membrane receptors, like EGFR or integrins, is one of the processes affected by mutated p53 in coordination with other member of p53 family, p63. From these exacerbated signaling pathways we identify that AKT activity is essential, specifically the AKT2 isoform is required for WIP stabilization, and the final YAP/TAZ stabilization and activity.

The oncogenic mechanisms discovered here have a key role in the establishment and maintenance of CSCs and consequently in the promotion of tumorigenesis in vitro and in vivo in glioblastoma and breast cancer models. The knowledge of these mechanisms will facilitate the design of novel drugs against these therapeutic targets in the tumor types analyzed.

En los últimos 50 años se ha estudiado profundamente la genética del cáncer y se ha observado que p53 aparece mutado en muchos tipos de tumores humanos. A pesar de lo que se cree de forma genérica, las mutaciones en p53 no solo causan una pérdida de la función supresora tumoral, si no también una acumulación de esta proteína generando una segunda función actualmente denominada ganancia de función oncogénica. Esta ganancia de función parece favorecer la adquisición de fenotipos tumorales más agresivos y con peor pronóstico.

Nuestro trabajo demuestra que la ganancia de función oncogénica de p53 mutante es crucial para el mantenimiento de las *cancer stem cells* (CSC), relacionándola de esta forma con una mayor capacidad tumoral. En el presente estudio, hemos identificado algunos de los componentes esenciales en el mecanismo de acción de diferentes mutantes de p53.

Hemos observado que WIP, una proteína asociada y reguladora del citoesqueleto de actina, se ve incrementada por la ganancia de función oncogénica de p53 mutante. Este aumento de WIP conduce a la estabilización de YAP/TAZ y su consecuente tránsito y actividad nuclear, favoreciendo el mantenimiento y el crecimiento del fenotipo de *stem*/mesenquimal y la capacidad invasora del tumor.

Uno de los procesos que se ven afectados por p53 mutante es el incremento de la señalización y del reciclaje de receptores de la membrana, como EGFR o integrinas mediado por la interacción de p53 mutante con otro miembro de la familia de p53, la proteína p63. En esta señalización exacerbada de p53 mutante/p63 hemos identificado que la actividad de AKT, específicamente la isoforma AKT2, es esencial para la estabilización de WIP y la estabilización y la actividad de YAP/TAZ.

Creemos que los mecanismos oncogénicos hallados tienen un papel primordial en el establecimiento y el mantenimiento de CSC y por lo tanto en el desarrollo de la tumorigénesis *in vitro* e *in vivo* en los modelos tumorales de glioblastoma y de carcinoma de mama. El conocimiento de estos mecanismos podrá facilitar el diseño de nuevos fármacos contra estas dianas terapéuticas en los tipos de tumores analizados.

Introducción

Todos los tejidos durante el desarrollo se caracterizan por tener un cuidadoso control en la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento y la división celular. Cuando una célula escapa al control del tejido produciéndose un crecimiento autónomo, sin respetar los mecanismos de control normales, se considera patológico y puede dar origen a tumores (Hanahan and Weinberg, 2011).

El griego Hipócrates alrededor del año 400 A.C. ya observaba e identificaba la presencia de tumores. Hoy en día empezamos a entender qué es el cáncer, cómo se forma y cómo podemos intentar combatirlo. Desde el punto de vista de la biología celular y molecular, el cáncer es un grupo de enfermedades causadas por genes defectuosos cuyos productos proteicos alterados, aumentados o ausentes, perturban una serie de señales intracelulares responsables de la conducta celular, generando un crecimiento anormal que conduce a la formación de tumores.

I. Características generales del cáncer.

Para convertirse en tumoral, una célula primaria debe adquirir de forma sucesiva una serie de capacidades biológicas que le permiten convertirse en tumorigénica (Hanahan and Weinberg, 2000). Algunas de las capacidades biológicas que caracterizan de forma general a las células tumorales son (Fig. I1):

1. Mantener las señales de proliferación y supervivencia.
2. Suprimir los mecanismos que evitan el crecimiento celular.
3. Resistir la muerte celular programada.
4. Favorecer la inmortalidad replicativa.
5. Inducir la angiogénesis.
6. Activar mecanismos de invasión y metástasis: *cancer stem cell* (CSC) y transición epitelio-mesénquima (EMT).



Figura I1. Capacidades biológicas que caracterizan a las células tumorales:
Adaptación de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Además de estas características básicas que debe adquirir una célula para convertirse en tumoral, también se han observado unas propiedades emergentes como disminuir la respuesta inmune, promover la inflamación, cambiar el metabolismo celular o generar una inestabilidad génica que conlleva un aumento en la cantidad de mutaciones ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

1. **Mantener las señales de proliferación y supervivencia.**

Una característica de las células tumorales es su capacidad para sostener la proliferación de forma crónica y autónoma mediante la desregulación de las señales de proliferación. Estas señales de proliferación son, en gran parte, factores de crecimiento que se unen a receptores de membrana de dos tipos genéricos: los receptores que contienen dominios tirosina quinasa (RTK) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como los receptores para LPA o S1P ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)). Los RTK contienen dominios tirosina quinasa, de este modo generan una activación de vías de señalización intracelular que regulan la proliferación celular y la supervivencia. Los GPCR activan a través de proteínas G señales similares, Ras-Raf-ERK y PI3K/AKT, pero usando adaptadores primarios diferenciales a los usados por las RTK ([O'Hayre et al., 2014](#)).

Aunque una de las primeras mutaciones oncogénicas encontradas fue en Ras ([Malumbres and Barbacid, 2003](#)), hoy en día los análisis genéticos de tumores humanos muestran ciertas mutaciones más frecuentes que podrían activar de forma constitutiva vías de señalización que promueven la proliferación y la supervivencia celular a demás de la vía Ras-Raf-ERK, donde tenemos como ejemplo la vía PI3K/AKT ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

La vía de señalización PI3K/AKT es conocida por su función en supervivencia y proliferación celular tras ser activada por factores de crecimiento que se unen a RTK. Se han encontrado mutaciones en la subunidad catalítica de PI3K, lo que promueve un aumento en la activación de las señales de AKT ([Jiang and Liu, 2009](#); [Yuan and Cantley, 2008](#)). También se han encontrado mutaciones de pérdida de función en PTEN, que pueden ser producidas por metilaciones en su promotor, lo que genera una amplificación de las señales de PI3K y promueven la tumorigénesis en una variedad de modelos experimentales de cáncer ([Jiang and Liu, 2009](#); [Yuan and Cantley, 2008](#)).

1.1 **AKT: mantenimiento de las señales de supervivencia y plasticidad celular.**

La vía PI3K/AKT es considera una de las vías más relevantes implicadas en el control de la supervivencia y división celular, tanto en células normales como en

tumorales. La participación de la vía PI3K/AKT en el desarrollo y progresión del cáncer ha sido ampliamente estudiada, observándose que algunos elementos pertenecientes a esta vía pueden aparecer mutados o modificados su actividad en distintos tipos de tumores favoreciendo de esta manera la tumorigénesis (Manning and Cantley, 2007).

La vía de señalización de PI3K/AKT se activa cuando señales extracelulares como factores de crecimiento se unen a RTK como el receptor de EGF (EGFR), el receptor de PDGF (PDGFR) y receptores de insulina, entre otros, desencadenando la activación de PI3K de clase I, la cual adiciona un fosfato a PIP₂ convirtiéndolo a PIP₃, reacción que puede ser invertida por PTEN. Cuando se encuentran PIP₃ disponibles en la membrana, AKT interacciona con ellos a través de su dominio PH, produciéndose un cambio conformacional en AKT, pudiendo de tal forma ser fosforilado por PDK en la threonina 308 y por el complejo de mTORC2 en la serina 473. Cuando AKT se encuentra fosforilado actúa como quinasa regulando múltiples sustratos que intervienen en procesos celulares como la supervivencia, proliferación y metabolismo. Entre los múltiples sustratos que pueden ser fosforilados por AKT se encuentran proteínas como MDM2, GSK3 α/β , FoXO, TSC2 y PRAS40, entre otras (Manning and Cantley, 2007) (Fig. I2).

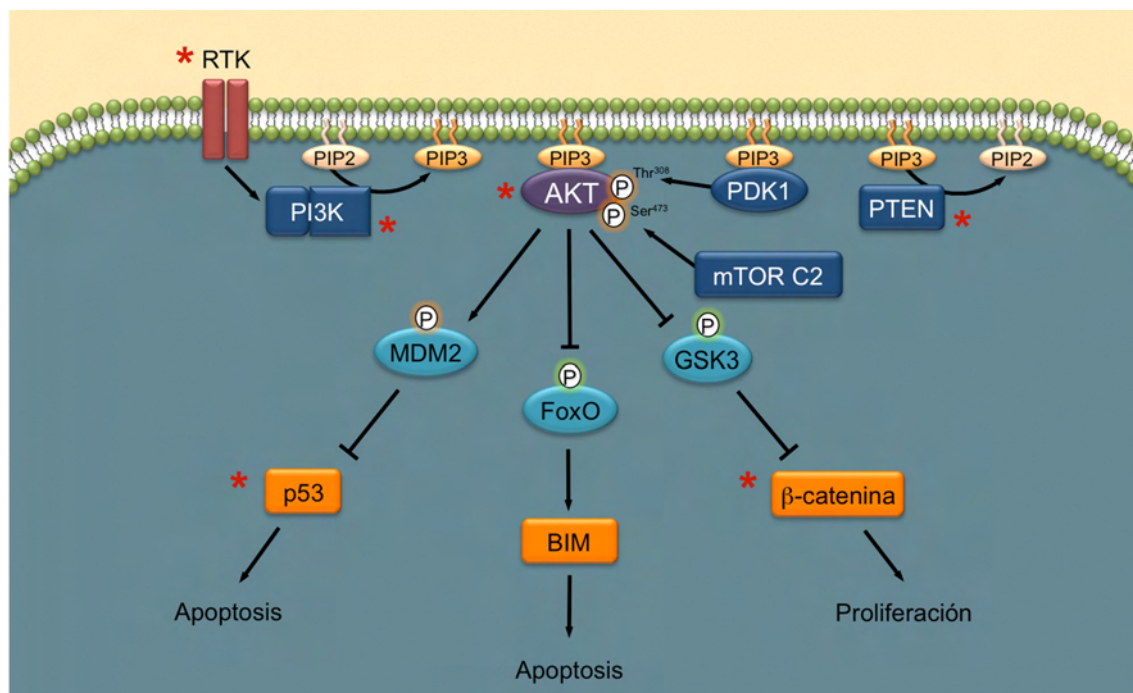


Figura I2. Vía de señalización PI3K/AKT:

Con un asterisco en rojo se han señalado las proteínas que aparecen más frecuentemente mutadas en el cáncer.

Un ejemplo de la importancia de la actividad de AKT en el proceso tumoral es su fosforilación inhibitoria en GSK3, lo que genera una estabilización y translocación al núcleo de β -catenina, favoreciendo la generación de las *cancer stem cells* (CSC). β -catenina actúa como cofactor de transcripción de genes implicados en procesos muy

relevantes en la agresividad tumoral como son la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la formación y mantenimiento de las CSC. Estos procesos dependientes de β -catenina generan una patología altamente agresiva en tumores de carcinoma mamario, donde se ha observado que la falta de actividad de PTEN es la responsable del aumento en la actividad de AKT ([Korkaya et al., 2009](#)).

1.1.1. Mutaciones frecuentes en el cáncer en la vía PI3K/AKT.

La presencia de mutaciones en algún punto de la vía PI3K/AKT que promueven un aumento en la actividad de esta vía son altamente frecuentes en el cáncer ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)) (**Fig. I7**). Algunos elementos de esta vía como, PI3K, PTEN o AKT, pueden controlar la proliferación de células tumorales y/o el mantenimiento de fenotipos tumorales agresivos. De hecho, con frecuencia AKT es activada en los cánceres humanos ([Bhaskar and Hay, 2007](#)) y su sobre-activación directamente por sobre-expresión, mutación o indirectamente a través de alteraciones en PTEN, genera en las células protección contra la apoptosis y en parte, promueve la progresión del ciclo celular ([Kandel et al., 2002](#)), dos importantes requisitos previos para la susceptibilidad del cáncer ([Hambardzumyan et al., 2008](#)).

Se han observado que distintos tipos de cáncer pueden presentar una sobre-activación de la vía PI3K/AKT mediante cambios en la actividad de RTK como el EGFR. El EGFR puede sufrir modificaciones que aumentan su actividad a través de múltiples sistemas, como por ejemplo por medio de su amplificación ([Ohgaki and Kleihues, 2007](#)), por medio de un aumento en el reciclaje de receptores de membrana ([Muller et al., 2014](#)) o por medio de suprimir la expresión de miR-27a, el cual inhibe directamente a EGFR ([Wang et al., 2013](#)).

Otro punto de la vía PI3K/AKT que se puede encontrar modificado por medio de mutaciones son la subunidad catalítica y la subunidad reguladora de PI3K de clase I ([Brennan et al., 2013](#)). Además, en el carcinoma de mama, colon-rectal, ovario y pulmón se han encontrado mutaciones oncogénicas directamente en AKT (AKT1 E17K). Esta mutación producen una modificación en su dominio de unión a PIP_3 favoreciendo esta unión y provocando una mayor actividad de AKT ([Askham et al., 2010](#); [Carpten et al., 2007](#)).

Por otro lado, son muy comunes en distintos tipos de cáncer las delecciones, mutaciones y metilaciones en el promotor que generan una pérdida en la actividad de la proteína PTEN, lo que promueve una activación en AKT ([Georgescu, 2010](#)). Recientemente, se ha visto que la pérdida de expresión de PTEN en células metastásicas de mama puede producir resistencia a tratamientos con nuevas terapias como el inhibidor de PI3K de clase I, BYL719 ([Juric et al., 2015](#)).

Se ha observado que las mutaciones en EGFR, PI3K y PTEN que generan una actividad sostenida en AKT son altamente frecuentes en glioblastomas, lo que genera un aumento en la proliferación y una inhibición de la apoptosis en este tipo de cáncer (Brennan et al., 2013; Ohgaki and Kleihues, 2007). Además, se ha observado que el 70% de los glioblastomas presentan un aumento en la actividad AKT asociado normalmente con pérdida de funciones de PTEN, regulando procesos de migración e invasión, lo que responde a un mayor grado de malignidad tumoral (Mure et al., 2010).

1.1.2. Isoformas de AKT e implicación con el cáncer.

AKT es una familia de quinasas con funciones no completamente redundantes que está constituida por tres isoformas codificadas en distintos genes, AKT1, AKT2 y AKT3. Las tres isoformas presentan una elevada homología de secuencia y las mismas regiones a nivel molecular (Dummler and Hemmings, 2007).

Aunque la activación de la vía PI3K/AKT está implicada en la progresión de la mayoría de tipos de tumores (Liu et al., 2009), el papel de cada isoforma de AKT en el desarrollo del tumor sigue siendo poco claro y se ha sugerido que estas tres isoformas de AKT podrían ejercer distinta función (Gonzalez and McGraw, 2009).

En diferentes modelos de cáncer de mama, AKT1 parece jugar un papel fundamental en la propagación de tales tumores (Chen et al., 2006; Ju et al., 2007), estableciéndose AKT1 como un oncogén (Carpten et al., 2007).

Recientemente, hemos descrito como la eliminación de la isoforma de AKT1 produce un claro descenso en la supervivencia de las células iniciadoras del tumor y una reducción en la generación y el crecimiento de las mamoesferas (Gargini et al., 2015). Sorprendentemente, la apoptosis de estas células iniciadoras del tumor, que se desencadena por la deficiencia de AKT1, también se ve asociada con una pérdida de las células con fenotipo *stem*/mesenquimal y una recuperación de marcadores epiteliales (Gargini et al., 2015). Estos resultados unen de forma directa el mantenimiento de la supervivencia con el mantenimiento del fenotipo *stem*/mesenquimal.

Por otro lado, AKT2 puede aparecer amplificado en una gran variedad de tumores, principalmente asociado a fenotipos metastásicos como es el caso del cáncer de colon (Rychahou et al., 2008) y en neuroblastomas (Qiao et al., 2013). AKT2 podría estar regulando el reciclaje de receptores de membrana como integrinas $\alpha 5 \beta 1$, ya que se ha observado como la eliminación o inhibición de AKT2 puede reducir en gran medida la invasión conducida por RCP- $\alpha 5 \beta 1$ (Jacquemet et al., 2013).

2. **Suprimir los mecanismos que evitan el crecimiento celular.**

Las células tumorales además de mantener señales proliferativas deben controlar la acción de los genes supresores de tumores como p53, Retinoblastoma, Neurofibromin 2 (NF2), etc. Decenas de supresores tumorales limitan el crecimiento celular y la proliferación a través de distintos mecanismos como, por ejemplo, la inhibición por contacto. Se ha visto que muchas células tumorales tienen suprimido este mecanismo, lo que favorece el desarrollo de la tumorigénesis ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

La vía Hippo es uno de los mecanismos que controla la inhibición por contacto, presentando un importante papel en el control del tamaño de los órganos y en tumorigénesis ([Zhao et al., 2010a](#)). El supresor tumoral NF2, también llamado Merlin, es una proteína asociada al citoesqueleto de la membrana y está implicada en la ruta de señalización Hippo. Merlin media la inhibición por contacto a través de moléculas de adhesión de la superficie celular como E-cadherina y RTK, o como el receptor de EGF (EGFR). Merlin interfiere la señal de EGFR de tal forma que células NF2^{-/-} tienen una señal de EGFR sostenida ([Curto et al., 2007](#)). Además, se ha visto que distintas células tumorales tienen una pérdida en Merlin ([Gutmann et al., 1997](#)). Por otro lado, las señales de supervivencia y proliferación que controlan la vía PI3K/AKT pueden regular la inhibición por contacto a través de Merlin. AKT fosforila a Merlin y lo ancla a la membrana plasmática a través de la unión a fosfoinosítoles inhibiendo de esta forma su función pro-apoptótica ([Okada et al., 2009](#)).

3. **Resistir la muerte celular programada.**

La muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural que puede evitar el desarrollo tumoral. Las señales celulares que desencadenan la muerte celular apoptótica son ahora ampliamente conocidas y muchas de ellas son generadas a través de daños en el DNA. Distintas investigaciones han revelado que los tumores que tienen un alto grado de malignidad inhiben la apoptosis, presentando así resistencia a quimioterapia y radioterapia ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

Existen distintos mecanismos por los cuales una célula tumoral puede inhibir la apoptosis, uno de ellos son las mutaciones en p53, eliminando así su función supresora de tumores (que detallaremos con más profundidad en el siguiente apartado).

Por otro lado, la falta de adhesión de la célula puede producir otro tipo de muerte celular denominada anoikis. Las células tumorales presentan una fuerte resistencia a este tipo de muerte, donde muchos oncogenes pueden imitar las señales

dependientes de anclaje evitando así el anoikis (Hanahan and Weinberg, 2011). La supervivencia de las células epiteliales depende de la adhesión a la matriz extracelular y de las uniones intracelulares, donde las moléculas de adhesión y los receptores de factores de crecimiento dan como resultado las señales fundamentales para el mantenimiento de la supervivencia celular (Schmelzle et al., 2007).

Cuando las células se encuentran sin adhesión, la pérdida de señalización de las rutas de integrinas y de EGFR inducen la muerte por anoikis a través de la expresión de proteínas pro-apoptóticas como BIM y Bmf. De este modo, la sobre-expresión de EGFR o de integrinas en células tumorales promueve la resistencia a la muerte celular por falta de adhesión, favoreciendo la liberación de las células del tumor primario hacia la posible metástasis (Reginato et al., 2003; Schmelzle et al., 2007). En una reciente publicación hemos demostrado que en células cultivadas en suspensión (sin adhesión, cultivo tipo *stem*), la falta de señalización en AKT-FoxO produce una muerte mediada por BIM (Gargini et al., 2015).

3.1 p53: un nombre, dos funciones.

El gen TP53 aparece mutado en más de la mitad de los tumores humanos (Vogelstein et al., 2000). El gen humano TP53 se encuentra localizado en el cromosoma 17p13.1 y codifica para una proteína de 393 aminoácidos y un peso molecular de 53 kDa denominada p53. La proteína p53 tiene un dominio de transactivación (TA) en su extremo N-terminal, un dominio rico en prolinas (PRD), un dominio de unión a DNA (DBD) y un dominio de tetramerización en su extremo C-terminal (Tet) (se puede encontrar un esquema de los dominios de la proteína más adelante, en la **figura I5**).

En 1979 se identificó por primera vez la proteína p53 en células transformadas con el virus SV40 (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Posteriormente, se demostró que en tejidos tumorales había una alta producción de p53, fenómeno que no se observó en el tejido normal, lo que sugirió que p53 era una proteína asociada al tumor pudiendo actuar como un oncogén (DeLeo et al., 1979; Rotter, 1983), estos resultados se vieron reforzados cuando al sobre-expresar el cDNA recientemente clonado de p53 se observó una cooperatividad con el oncogén Ras para transformar células primarias en cultivos (Eliyahu et al., 1984; Parada et al., 1984). De este modo, a lo largo de la primera década después de su descubrimiento, p53 fue clasificado con un proto-oncogén (Levine and Oren, 2009). Sin embargo, varios estudios posteriores pusieron en tela de juicio el papel de p53 como un proto-oncogén celular (Wolf and Rotter, 1984). En poco tiempo se observó que el gen p53 que fue clonado para estos primeros experimentos había sido aislado de células tumorales y

era una versión mutante del gen *wild type* (Muller et al., 2009), por lo que ya en la segunda década después de su descubrimiento, p53 fue caracterizado como un supresor tumoral (Finlay et al., 1989). Así, desde su aislamiento e identificación se observó la función dual de p53 dependiendo de su estado, de tal forma que podía actuar como supresor tumoral en su forma *wild type* o como oncogén en su forma mutada.

Aproximadamente una década después de la identificación del supresor tumoral p53 se identificaron dos genes relacionados con p53, p63 y p73. Ambos presentan una homología del 60% en el DBD con p53, de tal forma p63 y p73 regulan genes diana de p53 (Pietsch et al., 2008). Sin embargo, comparando los estudios en ratones p53^{-/-}, p63^{-/-} y p73^{-/-} (Donehower et al., 1992; Mills et al., 1999; Yang et al., 2000), se ha demostrado que, a pesar de que estas proteínas compartan claramente alguna actividad con p53, cada una de estas proteínas tienen funciones muy distintas. La interacción física de p53 mutante con miembros de la familia de p53, p63 y p73 es una de las mayores implicaciones en el cáncer que tiene p53 mutante. (Adorno et al., 2009; Muller et al., 2009; Weissmueller et al., 2014)

3.1.1. p53 *wild type*: Supresor tumoral.

Una de las principales funciones establecidas de p53 es su función como supresor tumoral, organizando la respuesta de la célula a los diferentes tipos de señales de estrés. Estas señales generan que p53 pueda regular el metabolismo de la célula, la parada de ciclo, la reparación celular, la senescencia o la apoptosis (Kruse and Gu, 2009).

La proteína p53 se encuentra expresada en casi todas las células normales y al contrario de lo que sucede con su forma mutante, p53 se encuentra en cantidades bajas, teniendo una vida media corta, debido a la regulación por proteínas como MDM2 que la ubiquitina y la lleva a degradación por proteosoma (Michael and Oren, 2003; Wang et al., 2009). Además, p53 es regulada por múltiples procesos post-traduccionales sufriendo modificaciones tanto en situación de homeostasis normal como en respuesta de estrés celular. Se ha observado que p53 tiene más de 36 diferentes aminoácidos que pueden ser modificados, observándose múltiples sitios de fosforilación (Kruse and Gu, 2009).

En el primer paso del modelo clásico de activación de p53, p53 se estabiliza (disminuyendo su degradación), posteriormente se une a secuencias específicas del DNA y a continuación interacciona con la maquinaria transcripcional activando la transcripción de genes diana (Kruse and Gu, 2009). Señales de estrés celular, como el daño en el DNA, provocan que proteínas quinasas como ATM, ATR y DNA-PK, entre

otras, fosforilen a p53. Dichas fosforilaciones impiden la unión de p53 con MDM2 lo que inhibe su degradación y favorece su acumulación (Canman et al., 1998; Roos and Kaina, 2013; Shieh et al., 1997). Al acumularse, p53 forma un tetrámero que se transloca al núcleo actuando como factor de transcripción de genes de inhibición del ciclo celular como p21. Además, también transcribe genes de reparación de DNA como p53R2 y GADD45. Si se consiguen reparar los daños, p53 transcribe MDM2, lo que produce una auto-regulación de su cantidad al ser degradado por proteosoma. Si, por el contrario, no se produce reparación en la célula, p53 se sigue acumulando y se une a promotores con los que tiene menor afinidad, transcribiendo genes pro-apoptóticos como BAX/PUMA/NOXA entre otros (Kruse and Gu, 2009) (Fig. I3).

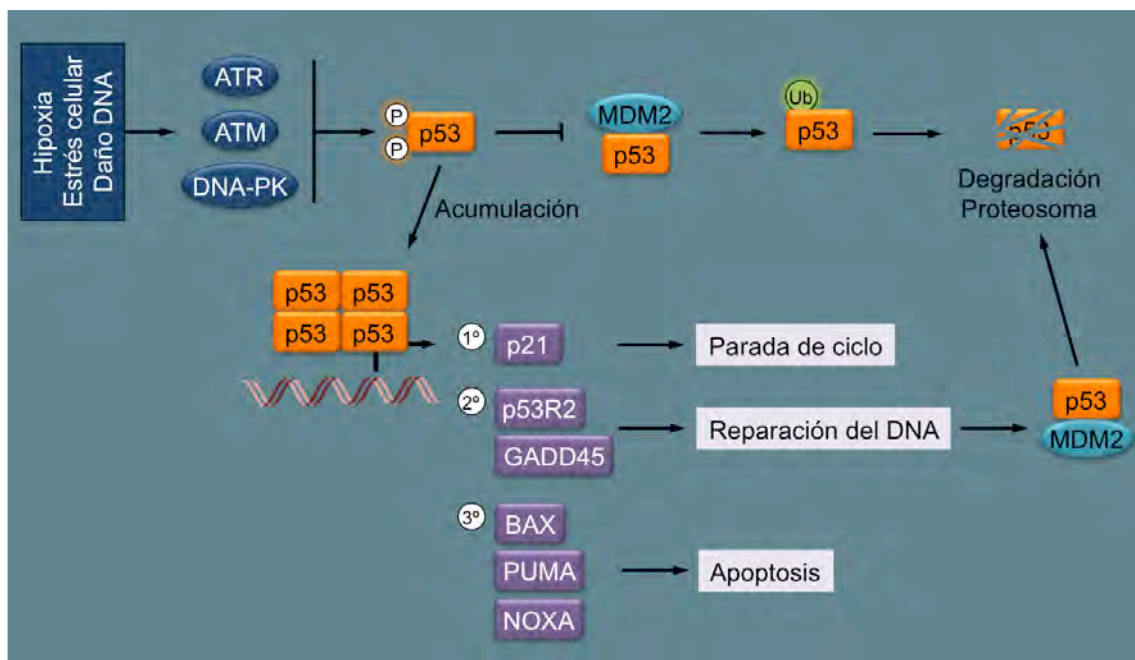


Figura I3. Modelo de activación de p53 *wild type*.

3.1.2. p53 mutante: Oncogén.

El gen TP53 es uno de los genes que aparece más comúnmente mutado en los distintos tipos de cáncer (Kandoth et al., 2013). Estas alteraciones aparecen a lo largo de toda la proteína, pero solo unas cuantas mutaciones han sido estudiadas más en profundidad por su contribución a la progresión del cáncer, ya que se ha observado que p53 mutante tiene propiedades oncogénicas, promoviendo procesos como la proliferación, la supervivencia celular, la invasión y la metástasis (Muller and Vousden, 2013).

En algunos casos, las mutaciones en el gen de p53 dan lugar a una proteína “sin sentido” y como resultado se produce la pérdida de la expresión de la proteína. Sin embargo, en las alteraciones asociadas a tumores, son más frecuentes las mutaciones en p53 de sustitución de un aminoácido (Muller and Vousden, 2013, 2014), donde se

ha observado que el 74% de los tumores con p53 mutante contienen el cambio de un aminoácido por otro (Brosh and Rotter, 2009). Las mutaciones de sustitución de un aminoácido pueden ocurrir a lo largo de toda la proteína, pero son más comunes en el dominio de unión a DNA de p53, donde hay seis aminoácidos considerados “puntos calientes” (R175, G245, R248, R249, R273, R282) (Fig. I4). Parece que estas mutaciones pueden modificar el plegamiento de la proteína y con ello su interacción tanto con otras proteínas como consigo mismo, impidiendo su función supresora tumoral (Muller and Vousden, 2013, 2014).

Además, se ha observado que muchos de los mutantes heterocigóticos de p53 generan una proteína mutante capaz de inhibir la función de p53 *wild type*. Se creó que puede ser debido a cambios en la formación del tetrámero que tiene que formar p53 *wild type* para actuar como factor transcripcional (Muller and Vousden, 2014).

Los datos parecen indicar que los mutantes de p53 pueden actuar como dominante negativo inhibiendo a p53 *wild type* (Muller and Vousden, 2014). De hecho, en un modelo de ratón que expresa la proteína p53 mutante R172H, se ha demostrado que la expresión de p53 *wild type* no produce una regresión tumoral como se observó en ratones que carecen de p53, demostrando el efecto dominante negativo de p53 mutante sobre el *wild type* (Wang et al., 2011).

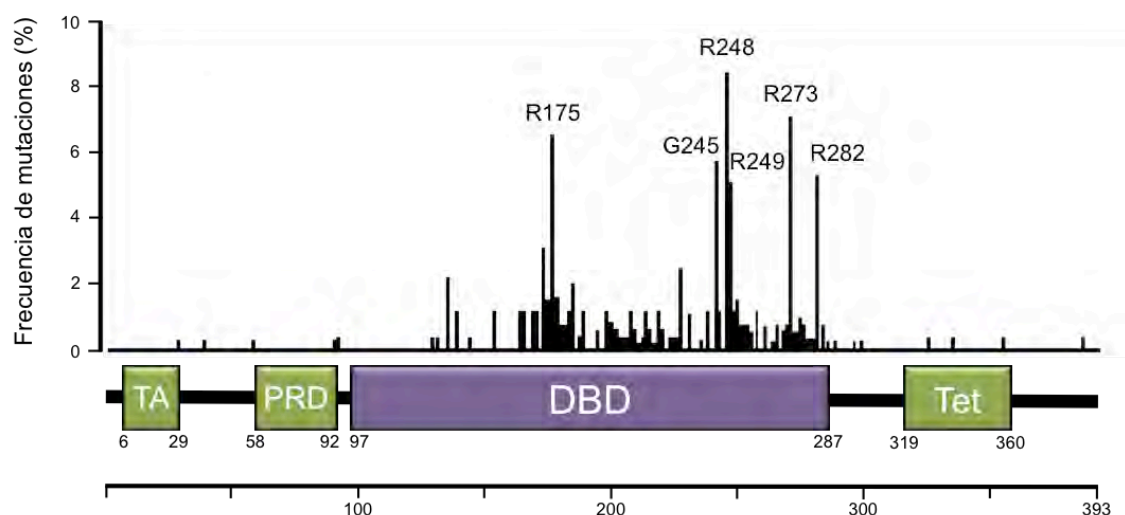


Figura I4. Frecuencia de mutaciones de p53 mutante y dominios de la proteína.:

TA: dominio de transactivación; PRD: dominio rico en prolina; DBD: dominio de unión a DNA; Tet: dominio de tetramerización.

3.1.3. p53 mutante: Ganancia de funciones.

Cada vez son más las evidencias de que p53 mutante tiene una pérdida de la función supresora de tumoral de p53 *wild type* y una ganancia de función que ayuda a contribuir en la malignidad del proceso tumoral (Muller and Vousden, 2014). Dentro de la ganancia de funciones que adquiere p53 mutante podemos resaltar: el aumento en

la proliferación y supervivencia celular, su implicación en procesos de migración, invasión y formación de metástasis, observándose un incremento en la formación de colonias y crecimiento en xenotransplantes. Además, p53 mutante promueve el proceso de EMT, aporta resistencia celular a la muerte por anoikis (favoreciendo el crecimiento en suspensión y la formación de mamoesferas), genera angiogénesis, inestabilidad génica y resistencia a quimioterapia y radioterapia (Muller and Vousden, 2014).

En 1993, se describe por primera vez el concepto de que p53 mutante puede presentar ganancia de función cuando al sobre-expresar un mutante de p53 en células que no expresaban p53 se observó que estas células mostraban un fenotipo tumoral más agresivo (Dittmer et al., 1993). Los ratones modelo del síndrome de Li-Fraumeni han sido la base para estudiar la ganancia de función de p53 mutante *in vivo*. El síndrome de Li-Fraumeni (SLF) es una enfermedad genética donde el 70% de las personas que lo padecen tienen una mutación en la línea germinal de uno de los alelos del gen TP53, presentando en todas sus células somáticas p53 mutante. Los portadores de SLF tiene mayor probabilidad de padecer cáncer en edades tempranas como cáncer de mama, sarcomas infantiles, osteosarcomas, leucemias y tumores cerebrales, entre otros (Kleihues et al., 1997). En modelos de ratón se observó que existían diferencias fenotípicas entre ratones que carecían de una o de las dos copias de p53 (p53^{-/-} o p53^{+/-}) con respecto a aquellos ratones con SLF que portaban al menos un alelo de p53 mutado, observándose que los ratones con p53 mutante generan un mayor rango de tipos de tumores con características agresivas, evidenciándose un aumento de metástasis y sugiriendo que p53 mutante aporta nuevas características a las células potenciando la malignidad tumoral (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004).

Existen distintos modelos de mecanismos por los cuales p53 mutante podría estar generando una ganancia de función. Uno de esos modelos es la unión de p53 mutante a sitios alternativos del DNA que le permitiría funcionar como un factor de transcripción oncogénico (Strano et al., 2007). Por ejemplo, se ha visto que distintos mutantes de p53 pueden inducir la transcripción de GEF-H1, lo que puede dar un aumento en la actividad de RhoA contribuyendo a la progresión tumoral (Mizuarai et al., 2006).

Por otro lado, otro modelo de ganancia de función de p53 mutante se debe a la interacción de p53 mutante con otras proteínas cambiando la función de estas proteínas directamente. Un ejemplo, es la interacción de p53 mutante con p63, un miembro de la familia supresora de tumores de p53. Esta interacción entre p53 mutante y p63 genera la inhibición de la función transcripcional de p63, produciendo

cambios en la expresión de genes tales como Dicer, RCP, DEPDC1, SHARP1 y ciclina G2, incrementa el reciclado de integrinas y receptores de factores de crecimiento, conduciendo a las células a la migración, invasión y metástasis. Además, múltiples proteínas pueden afectar a la capacidad de unión de p53 mutante con p63, entre las que podemos destacar SMAD2, PIN1 y ANKRD11, (Adorno et al., 2009; Kalo et al., 2007; Muller et al., 2009; Muller and Vousden, 2013).

Estos resultados unen la ganancia de función de p53 mutante con un aumento en el reciclaje de integrinas y receptores de factores de crecimiento a través del secuestro de p63. La interacción de p53 mutante con p63 mejora el reciclado y la señalización de receptores de superficie celular, mediante el acoplamiento de una RAB GTPasa de la familia de Rab11, RCP (Muller et al., 2009; Muller et al., 2013) (Fig. I5). Otro estudio muestra que p53 mutante puede disminuir la transcripción de Dicer. Mediante el uso de un p53 mutante con el extremo C-terminal truncado ($\Delta 347$) que no inhibe a p63, sugieren que p53 mutante puede actuar al menos parcialmente a través de TAp63 para regular la expresión de Dicer. La bajada de la expresión de Dicer promueve el reciclaje de receptores tirosina quinasa como MET (receptor para el factor de crecimiento de hematocitos) y EGFR promoviendo la migración, la invasión celular y la metástasis. Además, sus resultados apoyan la hipótesis de que p53 mutante previene la maduración de los pre-miRNAs mediante la inhibición de la expresión de Dicer, lo cual tiene una profunda implicación en la metástasis (Muller et al., 2014).

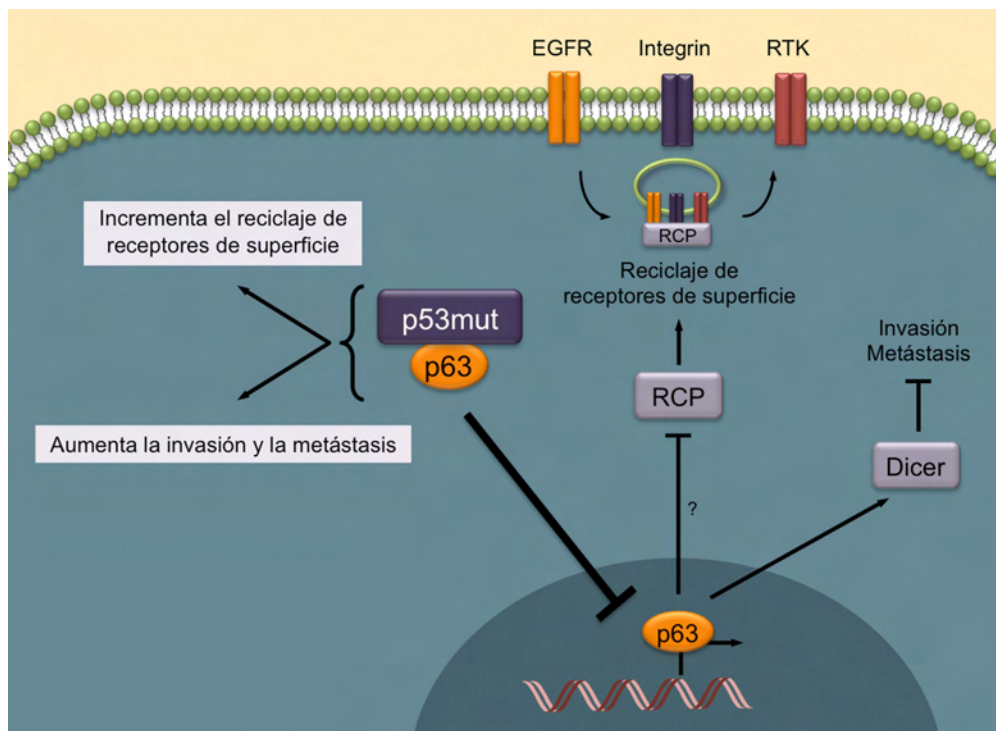


Figura I5. p53 mutante incrementa el reciclaje de receptores de superficie y aumenta la invasión y la metástasis a través del secuestro de p63.

Se ha observado que distintas células tumorales que tienen p53 mutante presentan resistencia a distintos tratamientos quimioterapéuticos debido a su incapacidad de transcribir genes de muerte como los antes mencionados (Bossi et al., 2006). Además, se ha descrito que p53 mutante, a través de una ganancia de función, puede promover esta resistencia por otros múltiples mecanismos como, por ejemplo, a través de la transcripción de TDP2 o a través de la inhibición de la expresión de miR-223 (Do et al., 2012; Masciarelli et al., 2014).

También se ha detallado como el mutante R273H de p53 puede unirse a la región promotora del microRNA miR-27a suprimiendo su expresión. Se ha identificado que EGFR es un target de miR-27a, de tal forma que p53 mutante puede sostener la señal de EGFR, lo cual facilita la proliferación celular y la tumorigénesis (Wang et al., 2013). Además, se ha descrito cómo algunos mutantes de p53 pueden generar mediante una ganancia de función un bloqueo del anoikis y con ello favorecer la progresión tumoral (Dittmer et al., 1993; Xie et al., 2013).

Otra ganancia de función que se ha observado en los mutantes de p53 es la posibilidad de generar cambios en el metabolismo celular. Las células tumorales utilizan principalmente la glicólisis aeróbica para la producción de energía, un fenómeno conocido como efecto Warburg. Los mutantes de p53 estimulan el efecto Warburg tanto *in vitro* como *in vivo*, observándose que p53 mutante promueve la translocación de GLUT1 a la membrana plasmática a través de la activación de RhoA (Zhang et al., 2013).

4. Favorecer la inmortalidad replicativa.

Las células cancerosas necesitan tener una capacidad proliferativa ilimitada con el fin de generar tumores macroscópicos y esta capacidad suele estar asociada al tamaño de los telómeros y a la función de la telomerasa. Aunque la primera función descrita para la telomerasa fue el control de la longitud de los telómeros y con ello el control de la inmortalización replicativa, hoy se ha visto que tiene funciones adicionales como la cooperatividad con la vía de Wnt (Park et al., 2009). Otro papel adicional de la telomerasa es la activación de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis (Kang et al., 2004).

En relación con p53, se ha visto que algún mutante de p53 puede inducir la expresión de la telomerasa y con esto favorecer la inmortalización replicativa (Scian et al., 2004).

5. Inducir la angiogénesis.

Tanto los tejidos normales como el tejido tumoral requieren de una irrigación sanguínea para obtener sustancias en forma de nutrientes y oxígeno o eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. Así, los tumores tienen asociado una neovascularización generada por procesos de angiogénesis ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)). VEGF es uno de los mediadores claves de la angiogénesis en el cáncer, encontrándose regulado tanto por la expresión de oncogenes como por hipoxia ([Carmeliet, 2005](#)). Recientemente incluso se ha encontrado que los glioblastomas tienen una subpoblación de células CD133⁺/CD144⁺ capaces de convertirse en células endoteliales y así favorecer la angiogénesis ([Wang et al., 2010](#)).

Por otro lado, se ha observado un aumento en supervivencia en pacientes diagnosticados con glioblastomas multiformes recurrentes mediante el uso de inhibidores de angiogénesis como el bevacizumab, que inhibe el factor de crecimiento endotelial VEGF ([Das and Marsden, 2013](#)).

El gen p63 (de la familia de proteínas de p53 y que tiene relación directa con la regulación de p53) puede transcribir la isoforma DNp63, considerada como una proteína con una posible función oncogénica, que aparece sobre-expresada en algunos tipos de tumores ([Crook et al., 2000](#); [Su et al., 2013](#)). Se ha observado que DNp63 puede modular la angiogénesis tumoral induciendo VEGF en neuroblastomas y osteosarcomas ([Bid et al., 2014](#)).

6. Activar mecanismos de invasión y metástasis: *cancer stem cell* (CSC) y transición epitelio-mesénquima (EMT).

Las células madre se definen por su capacidad de producir células no diferenciadas (auto-renovación) y células que se diferencian a través de la división celular asimétrica ([Morrison and Kimble, 2006](#)), donde la célula con fenotipo *stem* tiene baja proliferación mientras que la célula diferenciada tiene alta tasa proliferativa ([Cicalese et al., 2009](#)). Al igual que los tejidos sanos, los tumores están compuestos por poblaciones heterogéneas de células en distintos estados de diferenciación. El estado de diferenciación celular de un tumor resulta muy importante empleándose en anatomía patológica para la clasificación de los tumores ([Dalerba et al., 2007](#)). Muchos tumores tienen una subpoblación de células desdiferenciadas con características de células madre (*stem cell*) denominadas *cancer stem cells* (CSC) o células iniciadoras del tumor (TICs) ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

Las CSC fueron descritas por primera vez en Leucemia Mieloide Aguda como una subpoblación de células CD34⁺/CD38⁻ capaces de generar la enfermedad en

ratones inmunodeficientes (Lapidot et al., 1994). Desde entonces, empleando diferentes marcadores, se han identificado las CSC en una amplia variedad de tumores sólidos como, por ejemplo, en glioblastomas, donde las CSC son células $CD133^+$, o con alto contenido de Nestina (Singh et al., 2004), o en carcinoma de mama donde las CSC son células $CD44^{high}/CD24^{low}$ (Al-Hajj et al., 2003). Además, se han encontrado este tipo de subpoblaciones de células con características *stem* en otros tumores sólidos como en carcinoma colorrectal (O'Brien et al., 2007), cáncer de pulmón (Eramo et al., 2008), cáncer de próstata (Collins et al., 2005) o cáncer de páncreas (Li et al., 2007).

Se cree que las CSC son las células responsables de iniciar el crecimiento del tumor y mantenerlo, pudiendo tener alta capacidad migratoria e invasiva. Pero uno de los aspectos más relevantes de las células tumorales es que tienen la capacidad de entrar y salir del fenotipo *stem*, que define su plasticidad, a diferencia de las células *stem* normales que son, más bien, un componente de una estructura jerárquica (Scheel and Weinberg, 2011). Esta nueva interpretación pone de manifiesto una de las principales características de las células tumorales con fenotipo *stem*/mesenquimal: la adaptación. Así, dependiendo de las señales extracelulares o intracelulares, la célula tumoral puede intercambiarse entre *stem* o no-*stem* para proliferar, migrar o invadir dependiendo del contexto en el que se encuentre. Es lógico pensar que este tipo de fenotipo sea el responsable directo del desarrollo del tumor y la metástasis. Así, varias publicaciones han demostrado su implicación en la metástasis y la recurrencia tumoral, además de su importante papel en la resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Hanahan and Weinberg, 2000; Thompson and Haviv, 2011; Zeppernick et al., 2008) (Fig. I6)

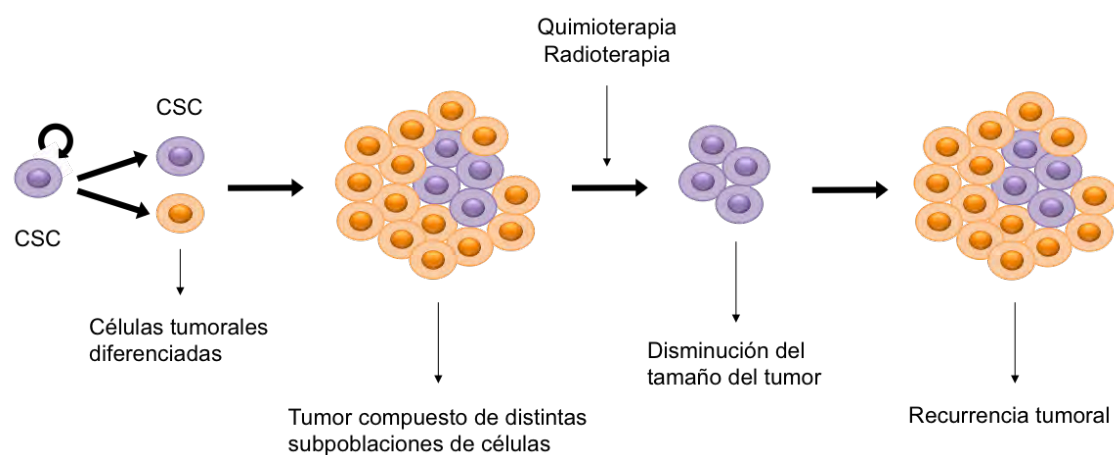


Figura I6. Hipótesis de quimio-resistencia y posible recurrencia tumoral generada por las CSC.

Los investigadores han relacionado la adquisición de un fenotipo de CSC con el programa de transdiferenciación celular EMT (transición epitelio-mesénquima) (Mani et

al., 2008), ya que la EMT puede inducir muchas características que requieren las CSC. La EMT son una serie de eventos que permiten a una célula epitelial convertirse en migratoria, eventos que ocurren en el desarrollo normal de los vertebrados y que pueden reactivarse en procesos tumorigénicos (**Fig. I7**).

Se ha visto que una característica del proceso de EMT son los cambios en las moléculas de adhesión. Este proceso es controlado por factores de transcripción como Slug, Snail o Twist, entre otros, favoreciendo la pérdida de uniones adherentes como, por ejemplo, mediante la represión de forma directa de la expresión de E-cadherina. Se ha observado que p53 mutante puede promover la EMT y con ello la invasión y la metástasis, a través de la regulación de Twist (Kogan-Sakin et al., 2011) o Slug, disminuyendo de esta forma la expresión de E-cadherina al producirse la estabilización de Slug por medio de la inhibición de MDM2 con p53 mutado (Wang et al., 2009).

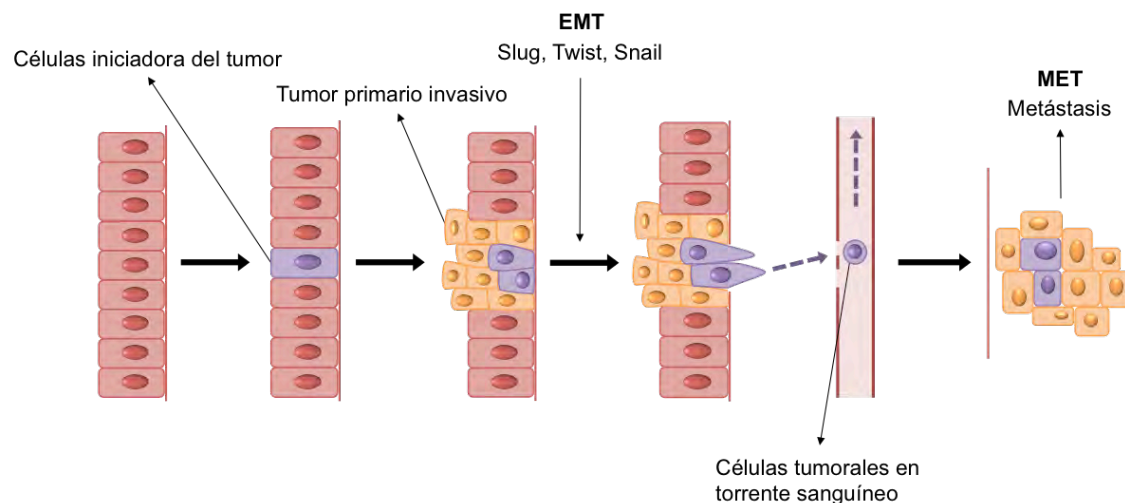


Figura I7. Proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), transición mesénquima-epitelio (MET) y metástasis.

El proceso de EMT conlleva también la resistencia a la muerte por falta de adhesión (anoikis). Recientemente hemos publicado que la falta de adhesión produce una muerte mediada por BIM y al inhibir esta muerte por medio de shBIM se favorece el establecimiento del fenotipo mesenquimal (Gargini et al., 2015).

El proceso de EMT conlleva también la degradación de la matriz extracelular (secreción de vesículas con enzimas de degradación) y el aumento en la movilidad (formación de estructuras de movilidad: lamelipodios, filopodios..), características que aparecen en los procesos de invasión y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2011).

6.1. Vía de HIPPO.

Recientemente, numerosos componentes que regulan la vía de Hippo han sido descritos en su implicación en polaridad, mecanotraducción y señalización de GPCR (Dupont et al., 2011; Yu et al., 2012). La vía de Hippo tiene un importante papel tanto en el control del tamaño de los órganos como en la tumorigénesis (Zhao et al., 2010a). Cuando las células en cultivo se encuentran en alta densidad, existe un control en el crecimiento entendiendo las señales del entorno y poniendo en marcha mecanismos de inhibición por contacto. La vía de Hippo es una de las rutas que coordinan crecimiento, mantenimiento de fenotipo *stem* y diferenciación, con lo cual tiene una profunda implicación en el cáncer y la progresión de la metástasis. Se ha observado que la ruta Hippo aparece modificada en muchos tumores, por ejemplo, mediante la pérdida de NF2 (Merlin) que conlleva una sobre-activación de YAP/TAZ (Gutmann et al., 1997; Lin and Gutmann, 2013).

La vía de Hippo es regulada por señales extracelulares, proteínas asociadas a membrana, uniones célula-célula y mecanotraducción (Mo et al., 2014). Cuando la vía de Hippo esta activa se produce una cascada de fosforilaciones que terminan inhibiendo a los factores de transcripción YAP/TAZ. De forma genérica, cuando la vía de Hippo es activada, Mst1/2 y Sav1 forman un complejo que fosforila a LATS1/2, y LATS1/2 fosforila a YAP/TAZ impidiendo su translocación al núcleo y provocando su posterior degradación a través de proteosoma tras ser fosforilado por otras quinasas, como CK1 (Liu et al., 2010; Moroishi et al., 2015; Yu and Guan, 2013; Zhao et al., 2010b) (Fig. I8). Por otro lado, se ha visto como el mutante YAP 5SA y el mutante TAZ 4SA, que tienen mutadas sus serinas, son indegradables al no poder ser fosforilados por LATS, mostrando que la sobre-expresión de dichos mutantes genera una alta capacidad tumorigénica (Zhao et al., 2007).

Cuando YAP/TAZ no esta fosforilado se transloca al núcleo donde interacciona con el factor de transcripción TEAD y otros, induciendo la transcripción de genes que promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis como AMOTL2, AREG (de la familia de EGF), Survivina, CTGF y CYR61 (Moroishi et al., 2015) (Fig. I8). Muchas de estas proteínas (CTGF, CYR61, AREG...) son secretadas al medio regulando la matriz extracelular y sirviendo como señales que activan la proliferación celular (Moroishi et al., 2015).

Se ha identificado que TAZ es requerida para mantener la auto-renovación de las células con características de *stem* de un tumor (Bhat et al., 2011; Cordenonsi et al., 2011). En la carcinogénesis de mama se ha observado que existe una correlación entre tumores con alto grado de metástasis y la actividad de YAP/TAZ. Se ha visto que las células que producen tumores de alto grado tienen mayor cantidad de YAP/TAZ,

incluso los altos niveles de expresión de YAP/TAZ correlacionan con una mayor capacidad de auto-renovación de las *stem* tumorales en comparación con las células que producen tumores de bajo grado. Al interferir TAZ se observa una bajada de la expresión de CTGF y Survivina, correlativa a la falta de crecimiento y pérdida de la capacidad tumoral (Cordenonsi et al., 2011).

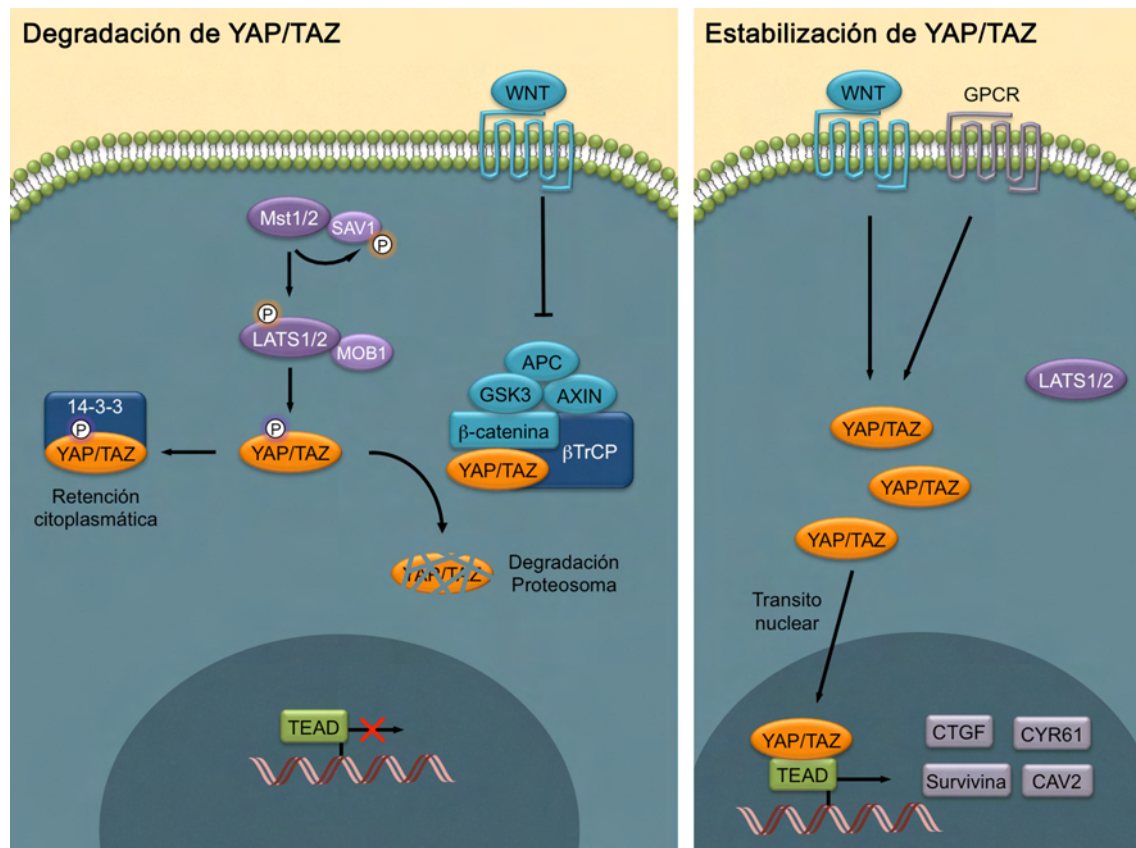


Figura I8. Mecanismos de degradación y de estabilización de YAP/TAZ

Además, se ha descrito que la transcripción de TAZ regula la diferenciación mesenquimal y la malignidad en gliomas, asociando a TAZ con células con características mesenquimales en los glioblastomas. TAZ es necesario en las células tumorales que expresan marcadores de invasión, auto-renovación e iniciación del tumor, mostrando una inducción de CTGF, CD44, CAV2, Fibronectin1 dependiente de TAZ/TEAD (Bhat et al., 2011).

Aunque YAP/TAZ se comportan como oncogenes, dependiendo del contexto YAP puede inducir tumorigénesis o actuar como un supresor tumoral induciendo apoptosis (Levy et al., 2008). Tras un daño en el DNA, c-Abl fosforila a YAP1 en Y357 estabilizándolo, p73 se une a YAP1 pY357 y ambos se unen a promotores proapoptóticos, transcribiendo genes como BAX (Levy et al., 2008). Este mecanismo de muerte resulta muy relevante en los cánceres de tipo hematopoyético (Cottini et al., 2014).

También se ha descrito a YAP como un mediador entre la vía de Hippo y la vía PI3K/AKT. Así, YAP media la actividad de PTEN a través de la directa expresión de miR-29 que tiene como diana a PTEN, lo que genera una regulación en AKT aumentando su actividad ([Tumaneng et al., 2012](#)).

6.1.1. Regulación de YAP/TAZ por la vía de Wnt.

Varios estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto la interacción entre YAP/TAZ y la vía de Wnt. YAP/TAZ pueden interactuar y cooperar con β -catenina en el núcleo para promover la activación transcripcional de genes diana como SOX2, BCL2L1, Survivina ([Rosenbluh et al., 2012](#)). Los estudios muestran que la señalización de Wnt promueve un incremento en el nivel de proteína de TAZ, aumentando su estabilización y su actividad ([Azzolin et al., 2012](#)). En ausencia de la actividad de Wnt, el complejo APC, AXIN y GSK3 se encuentra activo y GSK3 fosforila a β -catenina. Cuando β -catenina se encuentra fosforilada, la ubiquitin ligasa β TrCP se une a este complejo y la ubiquitina para posteriormente ser degradada. Se ha descrito que en esta situación de ausencia de actividad de Wnt, β -catenina fosforilada sirve como puente para que la β TrCP y YAP/TAZ se unan y sean ubiquitinadas y degradadas por el proteosoma ([Azzolin et al., 2012](#)) (**Fig. 18**). Además, a través ensayos de inmunoprecipitación, se ha observado que YAP/TAZ se encuentra unida al complejo de degradación de β -catenina y que es necesaria para la degradación de β -catenina ([Azzolin et al., 2014](#)).

6.2. Papel del citoesqueleto en la transformación tumoral.

La migración e invasión celular requieren la integración de varios procesos que incluyen: la modulación local de la estructura del citoesqueleto y de las fuerzas contráctiles, el reciclaje de las estructuras de adhesión al sustrato y de sus microfilamentos asociados y finalmente, la generación de dominios especializados y transitorios que median la degradación focal de la matriz extracelular (MEC).

Para que se puedan llevar a cabo estos procesos oncogénicos, la célula sufre cambios morfológicos asociados al citoesqueleto de actina. Así, el aumento de la capacidad migratoria o la posible independencia de su adhesión al sustrato (permitiendo la supervivencia en suspensión) y la adquisición de la capacidad para colonizar otros tejidos dependen en gran medida de su citoesqueleto de actina ([Li et al., 2010](#); [Li et al., 2001](#)). La familia de proteínas de pequeñas GTPasas (Rac, Cdc42, Rho...) controlan la dinámica de actina y los cambios en el citoesqueleto que acompañan la migración y la invasión tumoral ([Bishop and Hall, 2000](#); [Heasman and Ridley, 2008](#)).

También se ha descrito que entre las proteínas que regulan estos procesos, se encuentran Arp2/3 (nucleador de polímeros de actina), N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) y WIP (*WASP Interacting Protein*) (Chou et al., 2006; Garcia et al., 2012).

6.2.1. *WASP Interacting Protein: WIP.*

Pocas proteínas de interacción a actina han sido directamente relacionadas con la progresión tumoral hacia fenotipos tumorales agresivos, aunque su implicación en la invasión ha sido ampliamente estudiada. Así se ha demostrado que Arp2/3, N-WASP y WIP son componentes del invadopodia, una estructura que le permite a la células iniciar la invasión (Garcia et al., 2014).

WIP es una proteína ubicua de 503 aminoácidos codificada por el gen WIPF1. WIP es considerada una proteína multidominio que interacciona con actina en su extremo N-Terminal, con N-WASP en su extremo C-Terminal, y con otras proteínas que participan en la formación del invadopodio como cortactina, Nck y Tks5/FISH (Anton et al., 2002; Ramesh et al., 1997) (Fig. I9).

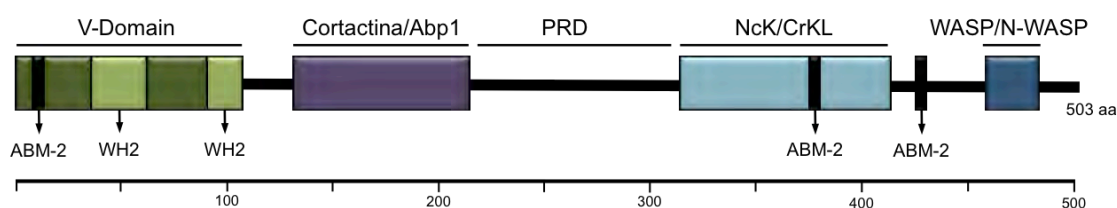


Figura I9. Estructura de WIP

V-Domain: Dominio de homología con Verprolin; WH2: (WASP-homology 2) Dominio para unión a actina; ABM-2: Dominio de unión a Profilin; Abp1: Proteína de unión a actina; PRD: Dominio rico en prolinas

La función de N-WASP está regulada por WIP que *in vitro* inhibe la nucleación de actina por Arp2/3 mediada por la activación de N-WASP a través de Cdc42 (Garcia et al., 2012). Utilizando células derivadas de ratones deficientes en WIP (WIP^{-/-}) (Burns et al., 2004) se ha descrito que WIP regula la estabilidad y localización de WASP y por tanto es esencial para la formación de podosomas, estructuras relacionadas con adhesión, migración y degradación de la MEC (Garcia et al., 2014). Además, hay evidencia de que WIP puede co-expresarse con p53, c-MYC y ESR1 (Staub et al., 2009), formando estos un perfil génico asociado con la proliferación o la apoptosis tumoral (Rosenwald et al., 2003), o incluso puede ser expresado cuando las células tienen fenotipo mesenquimal (Gu et al., 2007), aunque estos datos no han sido validados y sería necesario un análisis de cuál es la implicación de WIP en la patología del cáncer.

II. Sistema modelo. Tumores cerebrales: Gliomas.

Siendo conscientes de las grandes diferencias que puede haber entre los distintos sistemas modelo, decidimos elegir los tumores cerebrales gliales, ya que contábamos con glía primaria, líneas establecidas de glioblastomas humanos y glioblastomas procedentes de tumores humanos, lo que aporta un buen abanico de posibilidades para el análisis.

Por otro lado, sabemos que la falta de control en la división celular de células del sistema nervioso central puede dar como resultado diferentes tipos de tumores cerebrales primarios. Pese a representar aproximadamente el 1,9% de los tumores primarios en Europa, pertenecen al grupo de los 10 tipos de cánceres que provocan mayor mortalidad al año, teniendo una tasa de mortalidad de aproximadamente el 70% ([Ferlay et al., 2010](#)). Los tumores cerebrales primarios comprenden un diverso grupo de neoplasias con origen en diferentes linajes celulares. Dentro de los de origen neuroepitelial se encuentran los gliomas, que constituyen entre el 40 y el 60% del total de tumores cerebrales. Los gliomas son tumores que surgen a partir de células gliales o precursores neuronales. Dependiendo del origen del tipo de célula glial, los gliomas más habituales son los astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas.

Los oligoastrocitomas se componen en general de dos tipos histológicos diferentes, astrocitos y oligodendrocitos, mientras que los oligodendrogliomas están compuestos solamente de un tipo celular, los oligodendrocitos. Tanto los oligodendrogliomas como oligoastrocitomas son tumores gliales poco frecuentes, al contrario de lo que ocurre con los astrocitomas, tumores de origen astrocitario, que comprenden el 76% del total de los gliomas ([Pulkkanen and Yla-Herttuala, 2005](#); [Moore and Kim, 2010](#)).

Con el fin de unificar criterios para el diagnóstico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso un sistema de clasificación basado en la combinación de parámetros como la extensión de la masa tumoral, proliferación microvascular, alteraciones genéticas, necrosis o el índice de proliferación ([Louis et al., 2007](#)). El sistema consta de 4 grados que se van asignando secuencialmente según aumenta la agresividad del tumor.

Los tumores cerebrales de grado I son biológicamente benignos, capaces de ser eliminados mediante cirugía. En el caso de los astrocitomas, los astrocitomas de grado I son tumores localizados y no infiltrantes con bajo índice mitótico y leve proliferación microvascular. Los astrocitomas de grado II, también denominados astrocitomas

difusos, se caracterizan por ser lesiones infiltrantes de desarrollo lento y leve proliferación microvascular, por su naturaleza infiltrante son difícilmente eliminables por cirugía. Los astrocitomas de grado III, astrocitomas anaplásicos, muestran síntomas histológicos de agresividad, como lesiones infiltrantes con hiper celularidad, pleomorfismo celular y proliferación microvascular. También pueden aparecer posibles áreas necróticas, y al igual que los de grado II, son tumores difícilmente eliminables por cirugía, por su alta infiltración. Por último, tenemos los astrocitomas de grado IV, más conocidos como glioblastomas multiformes. Este grupo de tumores está constituido por neoplasias altamente agresivas de rápido desarrollo, con lesiones infiltrantes, gran hiper celularidad, propensas a la necrosis, pleomorfismo celular y proliferación microvascular, tampoco eliminables por cirugía (Louis et al., 2007; Maher et al., 2001). Además, hay que indicar que el 70% de los astrocitomas de grado II evolucionan a grado III ó IV en los 5 ó 10 años siguientes al diagnóstico (Maher et al., 2001).

1. **Glioblastomas multiformes.**

El astrocitoma de grado IV, más conocido como glioblastoma (GB) o glioblastoma multiforme (GBM) es el tipo de tumor cerebral primario más común y el de mayor agresividad (Louis et al., 2007). Existen dos subtipos de GB, el primario y el secundario. Los glioblastomas primarios suponen la mayoría de los casos (>90%), son tumores que surgen de nuevo en pacientes con una media de edad de 62 años y tienen un desarrollo rápido y altamente agresivo, mientras que los glioblastomas secundarios se generan por evolución de un astrocitoma de grado bajo, son tumores de desarrollo más lento y habitualmente se encuentran en pacientes más jóvenes (Maher et al., 2001; Moore and Kim, 2010; Ohgaki and Kleihues, 2007).

Los glioblastomas son tumores poco frecuentes en la población, representando menos del 2% de los cánceres diagnosticados en España, pero debido a las limitadas opciones de tratamientos para los pacientes que padecen GB, presentan un mal pronóstico y la supervivencia media más común es 14-16 meses después del diagnóstico (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Como ya hemos comentado, los GB son clasificados como tumores altamente infiltrantes, con bordes difusos donde las células tumorales invaden el parénquima cerebral, lo que hace imposible la delimitación de su contorno e impide la extracción quirúrgica completa. La proliferación microvascular, el alto índice mitótico y las áreas necróticas son características definitivas para su diagnóstico (Ray-Chaudhury, 2010). Todas estas propiedades son características que definen a los tumores con alta capacidad de migración e invasión, que presenta alto fenotipo mesenquimal con un

alto componente *stem*.

Los glioblastomas son tumores que pueden contener nivel altos de células con fenotipo mesenquimal y con características *stem*, en comparación con otros tipos de modelos tumorales más heterogéneos. Por tanto, resultan un buen modelo para el estudio de las CSC junto con otros tumores como los carcinomas mamarios.

1.1. Mutaciones más frecuentes en GB.

En un estudio masivo donde se analizaron 500 glioblastomas humanos se observó que las mutaciones más frecuentes y significativas que aparecen en los GB son en los genes TP53, PTEN (alterando su actividad y presentando mayor activación de AKT), en receptores de membrana como EGFR y PDGFRA, PIK3CA (subunidad catalítica p110a de PI3K), PIK3R1 (subunidad reguladora p85a de PI3K), NF1, RB1 y IDH1 ([Brennan et al., 2013](#)). Además, un alto porcentaje de las mutaciones de p53 de los GB recaen en los codones 248 y 273 ([Ohgaki and Kleihues, 2007](#)).

Por otro lado, se ha observado que mutaciones en IDH1 producen un aumento en onco-metabolitos que se podrían acumular *in vivo* contribuyendo a la progresión y malignidad del glioma ([Dang et al., 2009](#)). Otras investigaciones muestran que las alteraciones ATRX son frecuentes en astrocitomas de grado II y son específicas para tumores portadores de mutaciones en IDH1/2 y TP53. La alteración combinada de estos genes puede contribuir a impulsar el crecimiento neoplásico en un importante subconjunto de los astrocitomas de grado II pudiendo progresar de esta forma la enfermedad a grados de malignidad mayores ([Liu et al., 2012](#)).

Objetivos

Como hemos descrito en la Introducción, la mutación en p53 suele ser uno de los elementos más comúnmente modificados en los procesos oncogénicos que presentan mayor malignidad.

El propósito general de esta tesis es analizar qué elementos hay debajo de la actividad de p53 mutante para condicionar la supervivencia y la proliferación de una subpoblación de células denominadas *cancer stem cells* (CSC), ya que se considera que estas células son probablemente la base de la iniciación, del mantenimiento y las recidivas de muchos tumores.

Para ello, hemos desarrollado un cultivo en medio condicionado para favorecer el fenotipo *stem* (CSC) y hemos elegido dos modelos tumorales, los glioblastomas y los carcinomas de mama. Como sabíamos que la vía de PI3K/AKT suele tener un papel muy importante en supervivencia y en proliferación, tanto en células tumorales como en células primarias, decidimos que esta vía fuese una de nuestras referencias a analizar.

De forma concreta, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar el papel de p53 mutante en proliferación, supervivencia y mantenimiento de las CSC en modelos de glioblastomas y carcinoma de mama.
2. Analizar la posible relación entre p53 mutante y PI3K/AKT tanto en supervivencia como en proliferación de CSC.
3. Buscar nuevos elementos que pudiesen estar bajo el control de p53 mutante, para comprobar su posible papel en la transformación tumoral.
4. Analizar si elementos como YAP/TAZ, descritos como importantes en el mantenimiento de algunos tipos de CSC, están bajo el control de p53 mutante en modelos de glioblastomas y carcinoma de mama.

Material y Métodos

1. Cultivos celulares.

En este estudio se han utilizado las líneas celulares comerciales humanas que aparecen descritas en la **tabla 1**, donde se ha especificado el origen del tejido celular y el estado de p53, *wild type* o mutante.

Línea	Referencia ATCC	Origen	Estado de p53
Astrocitos	ScienCell # 1800	Astrocitos	<i>Wild type</i>
U-87 MG	HTB-14	Glioblastoma	<i>Wild type</i>
U-373 MG	HTB-17	Glioblastoma	Mutación R273H
Hs 683	HTB-138	Glioma	Mutante
MCF 10A	CRL-10317	Epitelio mamario	<i>Wild type</i>
T-47D	HTB-133	Carcinoma ductal mamario	Mutación L194F
MCF7	HTB-22	Adenocarcinoma mamario	<i>Wild type</i>
MDA-MB-468	HTB-132	Adenocarcinoma mamario	Mutación R273H
MDA-MB-231	HTB-26	Adenocarcinoma mamario	Mutación R280L
Hs 578T	HTB-126	Carcinoma mamario	Mutación V157F
HCT 116	CCL-247	Carcinoma de colorrectal	<i>Wild type</i>
HT-29	HTB-38	Adenocarcinoma de colorrectal	Mutación R273H
SW-480	CCL-228	Adenocarcinoma de colorrectal	Mutación R273H
SW-620	CCL-227	Adenocarcinoma de colorrectal	Mutación R273H
TOV-21G	CRL-11730	Adenocarcinoma de ovario	<i>Wild type</i>
TOV-112D	CRL-11731	Adenocarcinoma de ovario	Mutación R175H
HEK 293T/17	CRL-11268	Células epiteliales de riñón embrionario humano	<i>Wild type</i>

Tabla 1. Líneas celulares estables utilizadas.

Por otro lado, se han utilizado células troncales tumorales de pacientes humanos derivadas de biopsias de glioblastomas (denominadas GBsN, siendo N el número del paciente correspondiente). Estas células fueron cedidas por el laboratorio del la Dra. Marta Izquierdo y se contaba con el permiso del Comité Ético Institucional del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid.

2. Medios de cultivos.

Las células crecieron en dos condiciones, adheridas o en suspensión. Todas las células se mantuvieron en unas condiciones constantes de 37°C, 5% CO₂ y 97% de humedad relativa. Las líneas celulares que aparecen en la **tabla 1** crecieron adheridas en medio de cultivo denominado: DMEM 10% suero (según se describe mas abajo), excepto, la línea celular MCF 10A que fueron crecidas en medio de cultivo denominado: medio HS (detallado más abajo).

Los astrocitos humanos fueron descongelados en medio comercial para astrocitos (Astrocyte Medium (AM), referencia 1801, (ScienCell)) y mantenidos en este medio durante el primer pase, posteriormente, se cultivaron en DMEM 10% suero (según se describe mas abajo). Las líneas procedentes de los tejidos hormono-dependientes (mama y ovario) fueron crecidas en suspensión en el medio de cultivo denominado: CSC-B27 (según describimos abajo), mientras que el resto de líneas celulares (astrocitos, glioblastomas y carcinomas de colorrectal) fueron crecidas en suspensión en medio de cultivo denominado: CSC-N2 (según describimos abajo). Las células troncales tumorales de pacientes humanos derivadas de biopsias de glioblastomas (GBs) fueron crecidas únicamente en suspensión en medio CSC-N2.

Las especificaciones de los componentes de cada medio se describen a continuación:

2.1. **DMEM 10% suero.**

DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Media*) (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino (Sigma), 4 mM glutamina, aminoácidos no esenciales (L-Ala 44 mM, L-Asn 45 mM, L-Asp 40 mM, L-Glu 40 mM, L-Pro 30 mM), mezcla de antibióticos (Penicilina 63,2 mg/ml y Estreptomicina 0,1 mg/ml), Amphotericina B 1 µg/ml (Gibco). El sistema del complemento del suero fue previamente inactivado por incubación a 56°C durante 30 minutos.

2.2. **Medio HS.**

DMEM:F12 (1:1) suplementado con insulina 10 mg/ml (Gibco), EGF 20 ng/ml (Peprotech), hydrocortisona 0,5 mg/ml (Calbiochem), Cholera Toxin 100 ng/ml (Sigma) y suero de caballo al 5% (Gibco).

2.3. **CSC-B27.**

DMEM:F12 (1:1) con glutamax 1X (Invitrogen), suplementado con albumax I 0,5% (Invitrogen), Hepes 5 mM (Invitrogen), glucosa 0,915 % (Sigma), B27 sin vitamina A 1X (Invitrogen), FGF-2 15 ng/ml (Peprotech), EGF 20 ng/ml (Peprotech),

heparina 2 µg/ml (Sigma), mezcla de antibióticos (penicilina 63,2 mg/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml), Amphotericina B 1 µg/ml (Gibco). Se añadió un 20% de medio fresco dos veces por semana. Con este medio de cultivo se favorece positivamente la proliferación como esferas de células desdiferenciadas (*stem*) derivadas de líneas tumorales de origen de carcinoma de ovario y carcinoma de mama (mamoesferas) ([Ponti et al., 2005](#)).

2.4. CSC-N2.

DMEM:F12 (1:1) con glutamax 1X (Invitrogen), suplementado con albumax I 0,5% (Invitrogen), Hepes 5 mM (Invitrogen), glucosa 0,915% (Sigma), N2 1X (Invitrogen), FGF-2 15 ng/ml (Peprotech), EGF 20 ng/ml (Peprotech), heparina 2 µg/ml (Sigma), mezcla de antibióticos (penicilina 63,2 mg/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml), Amphotericina B 1 µg/ml (Gibco). Se añadió un 20% de medio fresco dos veces por semana. Con este medio se favorece positivamente la proliferación como esferas de células desdiferenciadas (*stem*) derivadas de tejido neural (neuroesferas) ([Reynolds and Weiss, 1992](#)) y de tejido de carcinoma de colorrectal.

3. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados se resumen en la **tabla 2**. El material genético fue crecido en condiciones estándar (medios LB, 37°C y agitación), en la bacteria *Escherichia coli* (cepa XL1-blue). A partir de estos cultivos, se purificaron los plásmidos mediante el kit de purificación PureLink HiPure Plasmid Filter DNA (Invitrogen). Se cuantificó la concentración y pureza del DNA en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

En este trabajo se empleó como herramienta principal el uso de plásmidos de tipo lentiviral y para ello, se utilizaron los siguientes plásmidos de empaquetamiento lentiviral:

pCMVdR8.74: vector que codifica los genes estructurales de los lentivirus y fue cedido por el Dr. D Trono.

pMD2.G: vector que codifica la proteína G de la envuelta del VSV (Addgene, #12259).

Por otro lado, también se utilizó plásmidos de expresión retroviral empleando los plásmidos de empaquetamiento retroviral que se describen a continuación:

pCMV-GAg-Pol: vector que codifica genes tempranos del retrovirus (GAg y Pol) (Cell Biolabs, RV-111)

pCMV-VSV-G: vector que codifica proteína de la envoltura para producir partículas lentivirales y retrovirales MuLV (Addgene, #8454)

Nombre corto	Nombre completo	Contenido	Tipo de vector	Selección en mamíferos	Procedencia
R175H	pLenti6/V5-p53_R175H	p53 humano mutante R175H	Lentiviral	Blasticidina	Addgene #22936
R273H	pLenti6/V5-p53_R273H	p53 humano mutante R273H	Lentiviral	Blasticidina	Addgene #22934
Control	pLenti CMV Blast DEST (706-1)	Plásmido vacío. Control de sobre-expresión de p53 mutante	Lentiviral	Blasticidina	Addgene #17451
GFP	pLNT/sffv-eGFP	GFP Control de sobre-expresión de WIP-GFP	Lentiviral	–	Cedido por Dr. G Jones
WIP-GFP	pLNT/sffv-eGFP-WIP	WIP fusión GFP humano	Lentiviral	–	Cedido por Dr. G Jones
Control	pBabe Hygro control	Plásmido vacío. Control de sobre-expresión de YAP WT /YAP 5SA	Retroviral	Hygromicina	Addgene #1765
YAP WT	pBabe YAP WT	YAP WT humano	Retroviral	Hygromicina	Cedido por Dr. KL Guan
YAP 5SA	pBabe YAP 5SA	YAP mutante 5SA humano	Retroviral	Hygromicina	Cedido por Dr. KL Guan
mcherry-co	mcherry control	Plásmido cherry. Control de sobre-expresión de integrina β 1	Lentiviral	–	Cedido por Dra. VM Weaver
Integrina β1	mcherry Integrina β 1	Integrina β 1-cherry humana	Lentiviral	–	Cedido por Dra. VM Weaver
pBlast	pMSCV Blasticidina control	Plásmido vacío. Control de sobre-expresión de EGFR	Retroviral	Blasticidina	Cedido por Dr. MV Lohuizen
EGFR	pMSCV Blasticidina EGFR WT	EGFR WT humano	Retroviral	Blasticidina	Cedido por Dr. MV Lohuizen
shco	pLKO.1 scramble	shRNA que no presenta ninguna diana en eucariotas	Lentiviral	Puomicina	Addgene #1864
shp53	shRNA TP53, SHCLNG-NM_000546: TRCN0000003755	shRNA contra p53 humano	Lentiviral	Puomicina	MISSION® ShRNA, Sigma
shWIP	shRNA WIPF1, SHCLNG-NM_003387 TRCN0000029825	shRNA contra WIP humano	Lentiviral	Puomicina	MISSION® ShRNA, Sigma
shTAZ	shRNA WWTR1 SHCLNG-NM_015472 TRCN0000370007	shRNA contra TAZ humano	Lentiviral	Puomicina	MISSION® ShRNA, Sigma
shYAP	pLKO.1 shRNA YAP1	shRNA contra YAP1 humano	Lentiviral	Puomicina	Addgene #42540
shAKT1	shRNA AKT1, SHCLNG-NM_009652: TRCN0000022936	shRNA contra AKT1 de ratón, también reconoce el humano	Lentiviral	Puomicina	MISSION® ShRNA, Sigma
shAKT2	shRNA AKT2, SHCLNG-NM_007434: TRCN0000055260	shRNA contra AKT2 de ratón, también reconoce el humano	Lentiviral	Puomicina	MISSION® ShRNA, Sigma
shGFP	pMKO.1 puro GFP shRNA	GFP shRNA. Control de shBIM	Retroviral	Puomicina	Addgene #10675
shBIM	pMKO shRNA BIM	shRNA contra BIM humano	Retroviral	Puomicina	Addgene #17235
shp63	shp63alpha pLHO.1 puro	shRNA contra p63 humano	Lentiviral	Puomicina	Addgene #19120

Tabla 2. Plásmidos empleados.

4. Generación de Lentivirus.

Para el empaquetamiento de lentivirus se utilizó la línea celular HEK 293T/17. Estas células crecieron en placas de cultivo p100 hasta obtener una alta confluencia entorno al 80% y se transfectaron en Opti-MEM (Invitrogen) con Lipofectamine Transfection Reagent (Invitrogen) y PLUS Reagent (Invitrogen) según protocolo de la casa comercial Invitrogen. Por cada placa de cultivo p100 se uso 10 µg de DNA del vector lentiviral, 6 µg de cada vector de empaquetamiento pM2D.G y de pCMV-dR8.74, 24 µl de PLUS Reagent y 36 µl de Lipofectamine Transfection Reagent. Tras incubar las células 24 horas, se cambió el Opti-MEM por medio de proliferación y se permitió a las células producir virus durante 24 horas. El sobrenadante fue recogido y filtrado con filtros de 0,45 µm de poro (Pall Corporation). Por último, los lentivirus fueron alicuotados y congelados a -80°C donde se almacenaron hasta su utilización.

5. Generación de Retrovirus.

Para la obtención de las partículas retrovirales se utilizó la línea celular HEK 293T/17. Las células fueron transfectadas en las mismas condiciones que en el empaquetamiento de lentivirus, utilizando 10 µg de DNA del vector retroviral, 6 µg de pCMV-GAg-Pol y 5 µg de pCMV-VSV-G, 24 µl de PLUS Reagent y 36 µl de Lipofectamine Transfection Reagent por cada placa p100. El sobrenadante retroviral fue recogido como se detalló para el caso de los lentivirus.

6. Infección de células.

6.1. Infección en líneas celulares.

Para la infección de las distintas líneas tumorales, se añadió 1 ml de partículas virales por cada 2 ml de medio de cultivo y 4 µg/ml de polibreno (Sigma). Se incubó durante 24 horas y se cambió a medio proliferativo. A continuación, se añadió el antibiótico correspondiente de selección según vector viral y en todos los casos se realizó una comprobación de la selección empleando células sin infectar.

6.2. Infección en GBs.

Las células procedentes de los explante de glioblastomas de tumores de pacientes humanos (GBs) tienen una dificultad a la hora de infectarlas ya que la infección en células que crecen en suspensión es poco eficiente. Para una correcta infección, se disgregaron las células y se plaquearon en placas de cultivos p100 con Opti-MEN suplementado con 10% de suero fetal bobino. Trascorridas 24 horas de adhesión, se añadió 1 ml de partículas virales por cada 2 ml de medio de cultivo y 4

µg/ml de polibreno (Sigma). Se incubó durante 24 horas y se cambió a medio proliferativo CSC-N2 (anteriormente descrito). A continuación, se añadió el antibiótico correspondiente de selección según vector viral. 24 horas después se levantaron las células y se plaquearon en suspensión en CSC-N2 en placas de cultivo Petri.

7. Tratamientos farmacológicos.

Las características de los compuestos farmacológicos empleados en este estudio se detallan en la **tabla 3**. Los tiempos de tratamientos se especifican en cada experimento.

Compuesto	Efecto	Concentración de uso	Origen
Cisplatín	Genotóxico	25 µM	Sigma
Q-VD-OPh	Inhibidor de caspasa	25 µM	Calbiochem
LY290042	Inhibidor de PI3K de clase I	20 µM	Tocris
GDC-0941	Inhibidor de PI3K de clase I	1 µM	Santa Cruz Biotech.
U0126	Inhibidor de MEK 1/2	10 µM	Sigma
Dasatinib	Inhibidor de SRC	200 nM	Tocris
Citocalasina	Inhibidor de la polimerización de actina	1 µM	Santa Cruz Biotech.
Y27632	Inhibidor de la proteína quinasa asociada a Rho, ROCK	10 µM	Tocris
MG132	Inhibidor del proteosoma	10 µM	Tocris

Tabla 3. Compuestos farmacológicos empleados.

8. Formación y conteo de esferas secundarias.

Para la amplificación de las células crecidas en condiciones *stem*, en primer lugar, las esferas se dejaron decantar. Posteriormente se tripsinizaron con Tripsina+EDTA, y transcurridos 5 minutos la proteasa se bloqueó con DMEM 10% suero. Las células en suspensión se centrifugaron a 1.200 rpm 5 minutos y se disgregaron y contaron. Posteriormente, las células con el tratamiento correspondiente fueron sembradas a una densidad de 125.000 células/ml en 8ml de medio de proliferación (CSC-N2 o CSC-B27, según tipo celular) en placas Petri. En los casos necesarios, se añadió antibiótico de sección correspondiente y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y 97% de humedad relativa. Estas esferas se utilizaron para la realización de los análisis bioquímicos.

De forma paralela se sembraron 1000 células/ml en 0,5 ml de medio de proliferación por pocillo (CSC-N2 o CSC-B27, según tipo celular) en placas de 24

pocillos que fueron utilizadas para plasmar el número de esferas. Para realizar el conteo del número de esferas secundarias formadas, se fotografiaron las esferas empleando un microscopio Axiovert200 (Zeiss) con un objetivo 5X en campo claro y se cuantificó manualmente el número de esferas generadas en cada caso. La media y la desviación estándar (SD) de los resultados se representaron gráficamente con el software Excel (Microsoft).

9. Contaje de número de células.

Para realizar el conteo del número de células formadoras de las esferas en condiciones *stem*, se centrifugaron las esferas secundarias a 1.200 rpm 5 minutos. Posteriormente, se tripsinizaron con Tripsina+EDTA y se bloqueó la proteasa con DMEM 10% suero. A continuación, se volvieron a centrifugar como antes, se resuspendieron en PBS y se disgregaron. Se contaron por triplicado las células vivas de cada tratamiento con Trypan Blue (Sigma) (colorante que tiñe las células muertas) con ayuda de una cámara de Neubauer. La media y la desviación estándar (SD) de los resultados se representaron gráficamente con el software Excel (Microsoft).

10. Viabilidad celular por MTT.

Para realizar los ensayos de viabilizar celular por MTT se sembraron 5.000 células en 100 µl de medio por pocillo en placas de 96 pocillos tras 48 horas post-infección lentiviral y selección con puromicina. Se tomó como tiempo cero del experimento a las 6 horas post-plaqueo y se recogieron tres tiempos cada 24 horas. Para analizar el crecimiento celular por MTT, se añadió 100 µl de medio fresco con 400 µg/ml de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H- tetrazolio) (Sigma). Transcurridas 2 horas de incubación, se retiró el medio y se disolvieron los cristales formados con 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). Por último, se cuantificó la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector OpsysMR (Dynex Technologies).

11. Formación de colonias en agar blando.

Para realizar los ensayos de crecimiento independiente de anclaje en agar blando se plaquearon 20.000 células viables por cada placa de 3,5 mm de diámetro. La capa base se hizo mezclando a partes iguales agar estéril 1% calentado a 40°C con medio de proliferación 2X, para obtener una dilución final de Agar 0,5% en DMEM completo 1X. Para la capa superior, el agar se diluyó en agua destilada a 0,7% calentado a 40°C con DMEM completo 2X, se dejó enfriar a 37°C y se añadió

inmediatamente las células a la mezcla, quedando a una dilución final de Agar 0,35% en DMEM completo 1X con 10.000 células/ml.

Las células se cultivaron durante 7 días a 37°C, 5% CO₂ y 97% de humedad relativa y las colonias viables fueron teñidas con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H- tetrazolio) (Sigma) a 600 mg/ml. Posteriormente, se fotografiaron las placas y se contabilizó el número de colonias/placa formadas utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

12. Formación de estructuras invasivas.

Para analizar las estructuras invasivas en los GBs, en primer lugar se disgregaron las esferas como se describe en el apartado 8. Antes de plaquear, las células se resuspendieron en 100 µl de matrigel (BD Bioscience) 1:50, favoreciendo de esta forma una mayor consistencia en la formación de las esferas. Posteriormente se plaquearon las células en CSC-N2 y se mantuvieron creciendo en cultivo 7 días.

A continuación, las esferas formadas se plaquearon en una mezcla de colágeno/matrigel. La mezcla de colágeno/matrigel se preparó en frío. En primer lugar se diluyó 0,5 ml de colágeno tipo I (BD Bioscience) 2,9-3,2 mg/ml con 62,5 µl de PBS 10X estéril y 62,5 µl de NaOH estéril 0,1 M con aproximadamente 10 µl HCl 0,1 N para llevar a un pH 7.5. Esta mezcla de colágeno se puso con matrigel (55% colágeno, 45% matrigel) y se añadió 46 µl del colágeno/matrigel por cada pocillo en placas de 96 pocillos dejándolo polimerizar durante 1 hora a 37°C. A continuación, se añadió entorno a 4 esferas por pocillo en 50 µl de medio CSC-N2 y finalmente se puso 50 µl de matrigel 2% en CSC-N2.

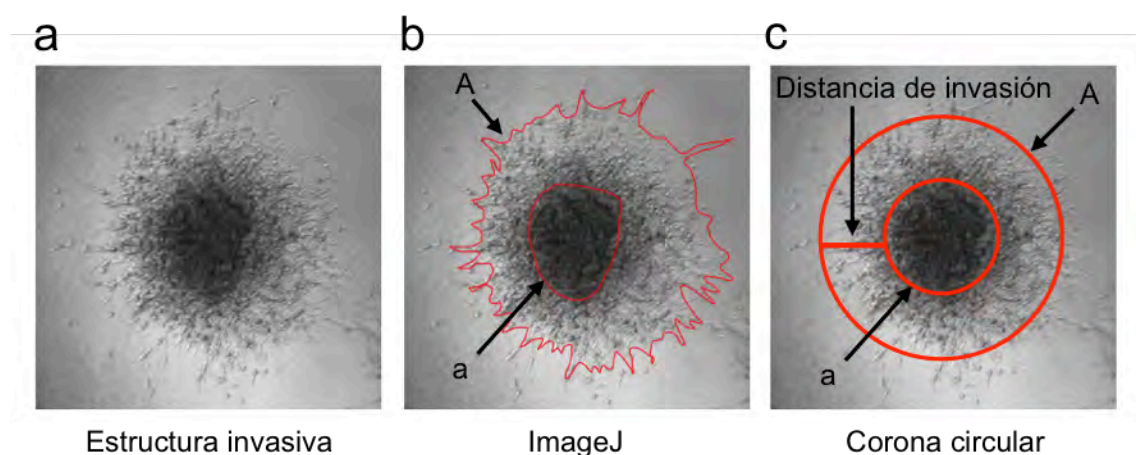


Figura M1. Distancia de invasión:

(a) Estructura invasiva. (b) Estructura invasiva donde 'A' es el área exterior y 'a' el área de la zona no invasiva. Ambas áreas obtenidas a través de ImageJ. (c) Simulación de la estructura invasiva a una corona circular. Radio de la corona circular denominado: Distancia de invasión. Tanto el área 'A' como el área 'a' tienen el mismo valor obtenido en (b).

Las estructuras invasivas se dejaron crecer durante 4 días y posteriormente se fotografiaron empleando un microscopio Axiovert200 (Zeiss) con un objetivo 5X en campo claro. Se midió el área exterior de las estructuras invasivas denominada 'A' y el área de interior de la estructura no invasiva denominada 'a' utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) de donde se obtuvo la distancia de invasión media de cada estructura invasiva simulándolas al radio de una corona circular según se muestra en la **figura M1** a través de la siguiente fórmula.

$$\text{Distancia de invasión} = \sqrt{\frac{A - a}{\pi}}$$

13. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (western-blot).

Para obtener los análisis bioquímicos a través de *western-blot* en primer lugar, las células con los tratamientos correspondientes fueron lavadas con PBS (*Phosphate Buffer Saline*), recogidas por centrifugación (3.000 rpm, 3 minutos a 4°C) y almacenadas a -20°C. Posteriormente, se extrajeron las proteínas totales de los extractos celulares resuspendiéndolos en tampón de lisis (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y 1% de SDS). Los extractos se incubaron a 95°C durante 15 minutos en agitación y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los extractos de proteínas se mantuvieron almacenados a -20°C.

La cantidad de proteína se cuantificó empleando el sistema *Dc protein assay* (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se desnaturalizaron 20 µg de proteína por cada condición en tampón de carga (Tris-HCl pH 6.8 6,5 mM, glicerol 25%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,5% y β-mercaptoetanol 5%) calentando las muestras a 95°C durante 10 minutos.

Las proteínas se separaron en función a su peso molecular por medio de una electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad) al 12%. Para la electroforesis se utilizó un tampón de electroforesis (*running buffer*) compuesto por Tris 25 mM (Sigma), glicina 250 mM (Sigma) y 0,1% SDS, y se mantuvo a un voltaje constante de 150 V. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Biotech) para su inmunodetección en un buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250 mM, metanol 20% ajustado a un pH 8.8) a voltaje constante de 30 V durante toda la noche a 4°C. Tanto para la electroforesis de proteínas como para la transferencia se utilizó el sistema MiniPROTEAN (BIO-RAD).

Terminada la electrotransferencia, las membranas de nitrocelulosa se sumergieron en una solución de Ponceau (Ponceau 6,5 mM (Sigma), acético glacial 1% (Panreac)) para comprobar la correcta transferencia y calibrar el equilibrado entre muestras. Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-T (PBS-Tween20 0,2%) en agitación. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% durante 1 hora para bloquear las uniones inespecíficas.

Anticuerpo	Casa comercial	Ref.	PM (kDa)	Isotipo	Uso WB	Uso IF
Actina	Sigma	A5441	42	Mouse	1:2500	
AKT1	Cell Signaling Biotech.	(2H10) 2967	60	Mouse	1:1000	
AKT2	Cell Signaling Biotech.	3063	60	Rabbit	1:500	
AKT3	Cell Signaling Biotech.	4059	60	Rabbit	1:500	
AKT pSer 473	Cell Signaling Biotech.	9271	60	Rabbit	1:1000	
AKT pThr 308	Cell Signaling Biotech.	2965	60	Rabbit	1:1000	
AKT	Cell Signaling Biotech.	9272	60	Rabbit	1:1000	
BIM	Chemicon	AB17003	23/15/12	Rabbit	1:1000	
Caspasa 3 Total	Cell Signaling Biotech.	9662	35/19/17	Rabbit	1:1000	
CD44	Cell Signaling Biotech.	3570	80	Mouse	1:1000	
CTGF	Santa Cruz Biotech.	(L-20) sc-14939	38	Goat	1:2000	
E-cadherin	Santa Cruz Biotech.	(H-108) sc-7870	135/120	Rabbit	1:500	
ERK pThr202/Tyr204	Cell Signaling Biotech.	9106	42/44	Mouse	1:1000	
FoXO 3A pSer253	Cell Signaling Biotech.	9466	97	Rabbit	1:1000	
GAPDH	Cell Signaling Biotech.	2118	37	Rabbit	1:5000	
Integrina β 1 total	Cedido por Dr. F Sánchez-Madrid	TS2/16	130	Mouse	1:10	
Nestina	BD Pharmingen	611658	200-220	Mouse	1:500	
p21	Santa Cruz Biotech.	sc-3976	21	Goat	1:500	
p53	Santa Cruz Biotech.	(DO-1) sc-126	53	Mouse	1:500	
p63	Santa Cruz Biotech.	(4A4) sc-8431	63	Mouse	1:500	
PTEN	BD Pharmingen	559600	54	Mouse	1:500	
Survivina	Santa Cruz Biotech.	(FL-142) sc-10811	16	Rabbit	1:2000	
WIP	Santa Cruz Biotech.	(H-224) sc-25533	55	Rabbit	1:500	
YAP/TAZ (D24E4)	Cell Signaling Biotech.	8418	50/70	Rabbit	1:1000	1:200
YAP pSer127	Cell Signaling Biotech.	13008	70	Rabbit	1:5000	

Tabla 4. Anticuerpos primarios:

PM: Peso molecular; WB: *Western-blot*; IF: Inmunofluorescencia.

A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de la **tabla 4** durante toda la noche a 4°C en agitación.

Posteriormente, las membranas se lavaron y dependiendo del isotipo del anticuerpo primario se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa, (*goat anti-mouse*, sc-2005; *goat anti-rabbit*, sc-2004; *donkey anti-goat*, sc-2033 (Santa Cruz Biotech)) a una dilución 1:5000 durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Todos los lavados se hicieron con PBS-T y la preparación de los anticuerpos primarios y secundarios se realizó en PBS-T 10% suero.

La presencia del anticuerpo secundario se puso de manifiesto por quimioluminiscencia incubando las membranas con 1,5 µl de H₂O₂ por cada 5 ml de la mezcla de luminol (Tris-HCl 100 mM pH 8.5; luminol (Sigma) 1,25 mM en DMSO y ácido cumárico (Sigma) 0,2 mM en DMSO) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Por último, las membranas se expusieron sobre una película fotográfica (Curix RP2 Plus medical X-ray film, Agfa HealthCare).

14. Inmunofluorescencia.

Para obtener las imágenes de la localización nuclear o citoplasmática de YAP/TAZ, las células se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y tras los tratamientos fueron fijadas durante 20 minutos en paraformaldehído 4%. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS y se eliminó la auto-fluorescencia incubando las células durante 15 minutos con NH₄Cl 50 mM.

El bloqueo de las uniones inespecíficas y la permeabilización de las membranas celulares se realizó mediante la incubación de 1 hora con PGT (PBS, *Gelatin from cold water fish skin* 0,22% (Sigma), Tritón X-100 0,1% (Sigma)). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario contra YAP/TAZ diluido 1:200 en PGT durante toda la noche a 4°C, se realizaron tres lavados con PGT y se incubó con el anticuerpo secundario específico (*Alexa-555 donkey anti-rabbit IgGs*, A-31572 (Invitrogen)) y con la sonda fluorescente DAPI (Merck, 268298) a 1 µg/ml para el marcaje de núcleos durante 45 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados con PGT seguidos de un lavado con PBS. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre Fluoromount G (Southern Biotechnology).

Para tomar las imágenes se utilizó un microscopio de barrido láser confocal multifotón LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss). Las imágenes se procesaron con los programas Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated) e ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) tomando como referencia de señal

cero las mismas muestras sin emplear anticuerpos (control de autofluorescencia) o únicamente con anticuerpos secundarios (control de autofluorescencia más inespecificidad de los anticuerpos secundarios).

15. Citometría de flujo.

En todos los experimentos analizados por citometría de flujo se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos por muestra en el citómetro FACSCalibur (BD Bioscience). Dichos eventos fueron pre-seleccionados mediante una región en base a su tamaño y complejidad (parámetros FSC y SSC, respectivamente) con el fin de excluir restos celulares u otras partículas contaminantes. Se utilizó el software CellQuest (BD Bioscience) para la adquisición de los eventos y el software FlowJo (Tree Star) para el análisis de los datos.

15.1. Determinación de muerte celular mediante Citometria de Flujo (Annexin V-FITC/7-AAD).

Para realizar el análisis de células muertas por apoptosis se cuantificó la población de células apoptóticas mediante la tinción Annexin V⁺/7AAD⁻. Transcurrido el tiempo determinado para cada ensayo las células se recogieron por tripsinización, se centrifugaron y se lavaron con PBS y posteriormente con tampón de unión (Hepes/NaOH 0,1 M pH 7.4, NaCl 1,4 M y CaCl₂ 25 mM). Finalmente, las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión suplementado con 5 µl de Annexin V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) y 5 µl de 7-AAD (7-amino-actinomicina D) ambos de BD Biosciences. Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en oscuridad. La adquisición y análisis de datos se realizó mediante el citómetro de flujo descrito anteriormente. Consideramos células apoptóticas tempranas a aquellas que presentaban marcación positiva sólo para Annexin V-FITC (Annexin V⁺/7AAD⁻).

15.2. Análisis de células con fenotipo *stem* mediante expresión de CD113.

El porcentaje de células *stem* se analizó mediante la expresión del receptor de membrana CD133. La expresión del receptor de membrana CD133 se analizó empleando el anticuerpo anti-CD133/2-APC (clon AC141, Miltenyi Biotec). Se resuspendieron las células en PBS (pH 7.2) con BSA 0,5% y EDTA 2 mM añadiendo 5 µl de anticuerpo por cada 1·10⁶ de células. Se incubó 15 minutos a 4°C y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente las muestras se analizaron en el citómetro FACSCalibur (BD Bioscience).

15.3. Análisis de células con fenotipo *stem* mediante expresión de CD44⁺ o CD24⁻/CD44⁺.

Para analizar el porcentaje de células CD44⁺ o CD24⁻/CD44⁺, se utilizaron los anticuerpos anti-CD44 (clon G44-26, BD Bioscience) y anti-CD24 (clon ML5, BD Bioscience). Se resuspendieron las células en PBS añadiendo 5 µl de anticuerpo por cada 1·10⁶ de células. Se incubó 15 minutos a 4°C y se realizaron dos lavados con PBS. Las muestras se analizaron posteriormente en el citómetro FACSCalibur (BD Bioscience).

15.4. Análisis de la expresión de integrina α6.

Para analizar la cantidad de integrina α6 que expresan las células se utilizó el anticuerpo anti-Human CD49f (BD Pharmingen). Se resuspendieron las células en PBS añadiendo 5 µl de anticuerpo por cada 1·10⁶ de células. Se incubó 15 minutos a 4°C y se realizaron dos lavados con PBS. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario *Alexa-647 goat anti-rat IgGs* (Invitrogen, A-21247) 1:500 15 minutos a 4°C y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente las muestras se analizaron en el citómetro FACSCalibur (BD Bioscience).

16. Obtención de RNAs, realización de RT-qPCR y secuenciación.

Para obtener el RNA, las células fueron recogidas por centrifugación (3.000 rpm, 2 minutos a 4°C) y almacenadas a -80°C. El RNA total fue extraído empleando TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa y la concentración se cuantificó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific). Tanto la retrotranscripción como la RT-qPCR a tiempo real se realizaron en el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid. Para la retrotranscripción se partió de 1µg de RNA de cada muestra empleando el kit *High capacity cDNA achieve* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las qPCR se empleó el tipo de marcaje por sondas TaqMan (Applied Biosystems). En todos los casos, se realizaron tres experimentos independientes y, de cada uno de ellos, se realizaron RT-qPCRs por triplicado.

Como control endógeno para este ensayo, se empleó el gen GAPDH (Hs 99999905_m1, Applied Biosystems). Para el resto de genes analizados por RT-qPCR, se diseñaron cebadores utilizando el programa *GeneFisher* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>). Este experimento se realizó en un equipo ABI PRISM 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).

La secuenciación de p53 se realizó en el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid, donde se secuenció a partir del RNA los exones 5, 6, 7 y 8 de p53.

17. Inducción de tumores en modelo de ratón inmunodeficiente.

Para la inducción de tumores subcutáneos se utilizaron 8 ratones machos inmunodeficientes desnudos (cepa Nude Mice Foxn1nu, Harlan) de 2 meses de edad. Se inoculó $1 \cdot 10^6$ células de la línea MDA-MB-231 subcutáneamente en los flancos izquierdo superior e inferior y derecho superior e inferior de los ratones mediante la inyección en un volumen de 100 μ l en DMEM 10% suero, según se especifica en el la **figura M2**. Las células fueron inoculadas trascurridas 48 horas de interferencia y selección con los lentivirus shco y shp53. El tamaño de los tumores (mm^3) fue medido cada 4 días con un calibrador y calculado con la siguiente fórmula.

$$\text{Volumen del tumor} = \frac{\pi}{6} (\text{diametro medio})^3$$

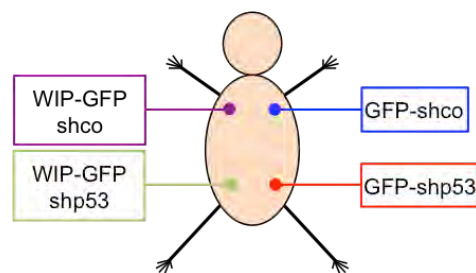


Figura M2. Esquema de inoculación subcutánea.

18. Tratamiento estadísticos de los datos.

A partir de los resultados obtenidos de cada experimento, se calcularon los valores medios y las desviación estándar (SD). La comparación estadística de los grupos de datos se realizó mediante el análisis de la *t* de *Student* y las diferencias se representan con la significancia estadística o p-valor donde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Resultados

1. Efecto de p53 mutante sobre supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.

1.1. Caracterización del estado de p53 y su posible correlación con la actividad de AKT en linaje glial.

En un primer abordaje, nos centramos en la relación entre la presencia de p53 y la actividad de AKT en linaje glial. Para ello, caracterizamos los niveles de p53 y la actividad de AKT tanto en astrocitos primarios como en distintas líneas de glioblastomas (**Fig. R1**) y observamos que las células Hs 683 y U-373 MG, descritas como p53 mutante ([Chen et al., 2011](#); [Datta et al., 2002](#)), presentan un nivel muy alto de p53, debido a que p53 mutante se puede estabilizar en las células tumorales ([Alexandrova et al., 2015](#); [Terzian et al., 2008](#)). Por otro lado, el análisis de los astrocitos primarios y de la línea U-87 MG indican un nivel bajo de p53, un resultado esperado pues no hay mutaciones reportadas en ambos casos ([Chen et al., 2011](#); [Datta et al., 2002](#)).

Una de las mutaciones más comunes que presentan los glioblastomas es la falta de actividad en PTEN lo que promueve un aumento de la actividad de AKT ([Brennan et al., 2013](#)). Cuando analizamos los niveles de esta fosfatasa podemos observar como las líneas tumorales U-87 MG y U-373 MG presentan un nivel muy bajo de PTEN, en contraste con la línea de astrocitos primarios, como muestra el *western-blot* (**Fig. R1**). La actividad de AKT se puede medir a través de los niveles de fosforilación de dos de sus residuos, serina 473 y threonina 308 (Ser473 y en Thr308) ([Manning and Cantley, 2007](#)).

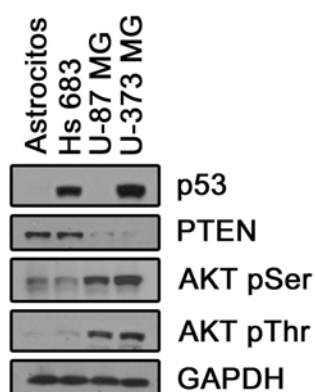


Figura R1. Caracterización de los niveles de p53 y de la actividad de AKT en líneas de glioblastomas:

Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, PTEN, AKT pSer, AKT pThr y GAPDH como control de carga.

Podemos observar por *western-blot* que las líneas U-87 MG y U-373 MG presentan tanto un bajo nivel en PTEN como un mayor nivel de fosforilación de AKT en Ser473 y en Thr308 (**Fig. R1**), teniendo una consecuente mayor actividad de AKT,

en comparación con las células que tienen una actividad normal en PTEN como los astrocitos primarios y la línea celular Hs 683.

1.2. p53 mutante y su respuesta al daño en el DNA.

Para caracterizar el estado de p53 *wild type* (WT) o mutante, a partir de una serie de células de explantes procedentes de tumores de glioblastomas humanos (GBs) se realizó un ensayo de funcionalidad de p53 como elemento de respuesta a genotóxicos. Se ha descrito que la funcionalidad de p53 como supresor de tumores se puede poner en evidencia mediante la respuesta al daño en el DNA ([Canman et al., 1998](#); [Kruse and Gu, 2009](#); [Roos and Kaina, 2013](#); [Shieh et al., 1997](#)). Así, compuestos anti-tumorales como el cisplatino producen daño en el DNA y han sido usados como quimioterapéuticos en distintas terapias contra el cáncer. Al administrar cisplatino se produce la activación de los mecanismos que acumulan p53 WT promoviendo su función como supresor tumoral, donde p53 WT transcribe genes de parada de ciclo como p21, entre otros ([Burger et al., 1997](#)).

Para tener una referencia concreta del ensayo de funcionalidad de p53 como supresor tumoral, antes de usar las células procedentes de los glioblastomas humanos, hicimos una validación de la respuesta a cisplatino tanto en astrocitos primarios (p53 WT) como en las líneas tumorales establecidas U-87 MG (p53 WT), Hs 683 (p53 mutante) y U-373 MG (p53 mutante), ya que la respuesta final resultaba previsible.

En la **figura R2a** podemos comprobar que en astrocitos y en la línea celular U-87 MG el cisplatino promueve la acumulación de p53 induciendo un aumento en uno de sus genes diana, la proteína p21 ([Burger et al., 1997](#)). Podemos evidenciar a través de este ensayo que, en los astrocitos primarios y en las U-87 MG, p53 funciona como supresor tumoral. Por el contrario, las líneas celulares Hs 683 y U-373 MG presentan una acumulación basal de p53 alta, que no varía con el cisplatino y que no es funcional a nivel de transcripción de p21, no observándose un aumento en dicha proteína. Se evidencia de esta forma que las líneas células Hs 683 y U-373 MG tienen p53 mutante.

Tras la validación del ensayo, nos planteamos caracterizar la funcionalidad de p53 como supresor tumoral en una serie de explantes procedentes de tumores de glioblastomas humanos (GB4, GB7, GB11, GB18 y GB19). Estos glioblastomas procedían de una colaboración con la Dra. Marta Izquierdo y ya habían sido parcialmente caracterizados.

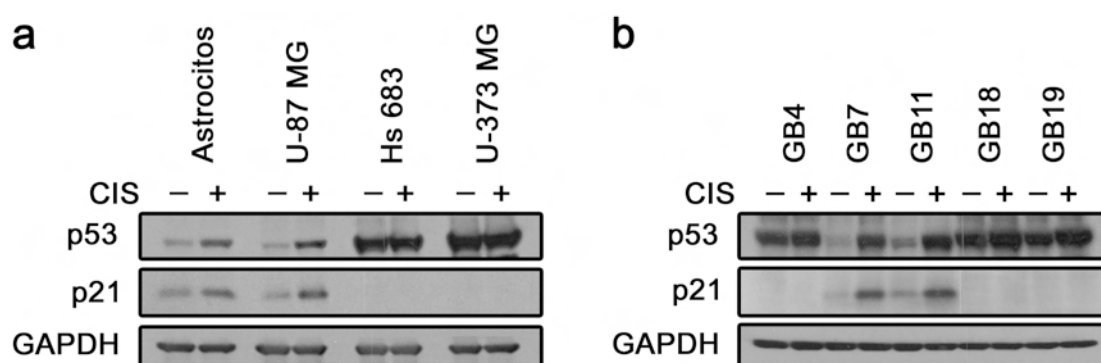


Figura R2. Comprobación de la funcionalidad de p53 WT y mutante como supresor tumoral:

Distintas líneas celulares establecidas (a) y GBs (b) tratadas con cisplatino (CIS) 25 μ M durante 24h. Los extractos totales de proteínas se analizaron por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, p21 y GAPDH como control de carga.

Así, estas células fueron tratadas en paralelo y a tiempos similares a los de los cultivos controles en líneas celulares establecidas, determinando los niveles de p53 y p21 a partir de los extractos totales de proteínas. En la **figura R2b** podemos observar como los gliomas GB4, GB18 y GB19 presentan, de forma basal, alta cantidad de p53 que no varía con el tratamiento de cisplatino, lo que demuestra, junto con la ausencia transcripcional de p21, que p53 no es funcional como supresor tumoral. De tal modo, podemos deducir que en los explantes de glioblastomas de pacientes GB4, GB18 y GB19, p53 se comporta como mutante.

Por otro lado, observamos que GB7 y GB11 tienen una cantidad basal baja de p53 que aumenta con el tratamiento de cisplatino. Esta acumulación de p53 se ve acompañada de un aumento en p21, por lo que GB7 y GB11 deben de tener un p53 que actúa comportándose como WT a nivel transcripcional.

A través de la secuenciación del gen p53 en los explantes de glioblastomas GB4, GB7, GB11, GB18 y GB19 se comprobó que GB7 y GB11 presentan p53 en estado WT, mientras que, GB4 tiene p53 mutante R273H y GB18 y GB19 tienen p53 mutante G245R. Comprobando así que estas mutaciones generan una sobre-estabilización y acumulación de la proteína como se observa en la **figura R2b**.

1.3. Análisis de la supervivencia y proliferación de líneas tumorales que expresan p53 mutante endógeno.

Se ha sugerido que la transformación debida a la mutación en p53 podría disparar una serie de cambios pleiotrópicos, algunos de los cuales, van en el sentido de potenciar proliferación, supervivencia, bloqueo de programas de muerte, etc. (Muller and Vousden, 2014).

Así, nos hemos planteado poder determinar en qué medida p53 mutante confiere mayor potencia en proliferación celular y aporta mayor supervivencia a los

glioblastomas. Para ello, hemos usado la técnica de la interferencia de RNA a través de sistemas lentivirales que nos aseguran una infección cercana al 85-90%. Así pues, usaremos un shRNA de interferencia para p53 (shp53) y un shRNA control contra una secuencia inespecífica (shco). Generadas estas partículas lentivirales (descrito en Materiales y Métodos) hemos infectado inicialmente las líneas células de glioblastomas Hs 683 y U-373 MG.

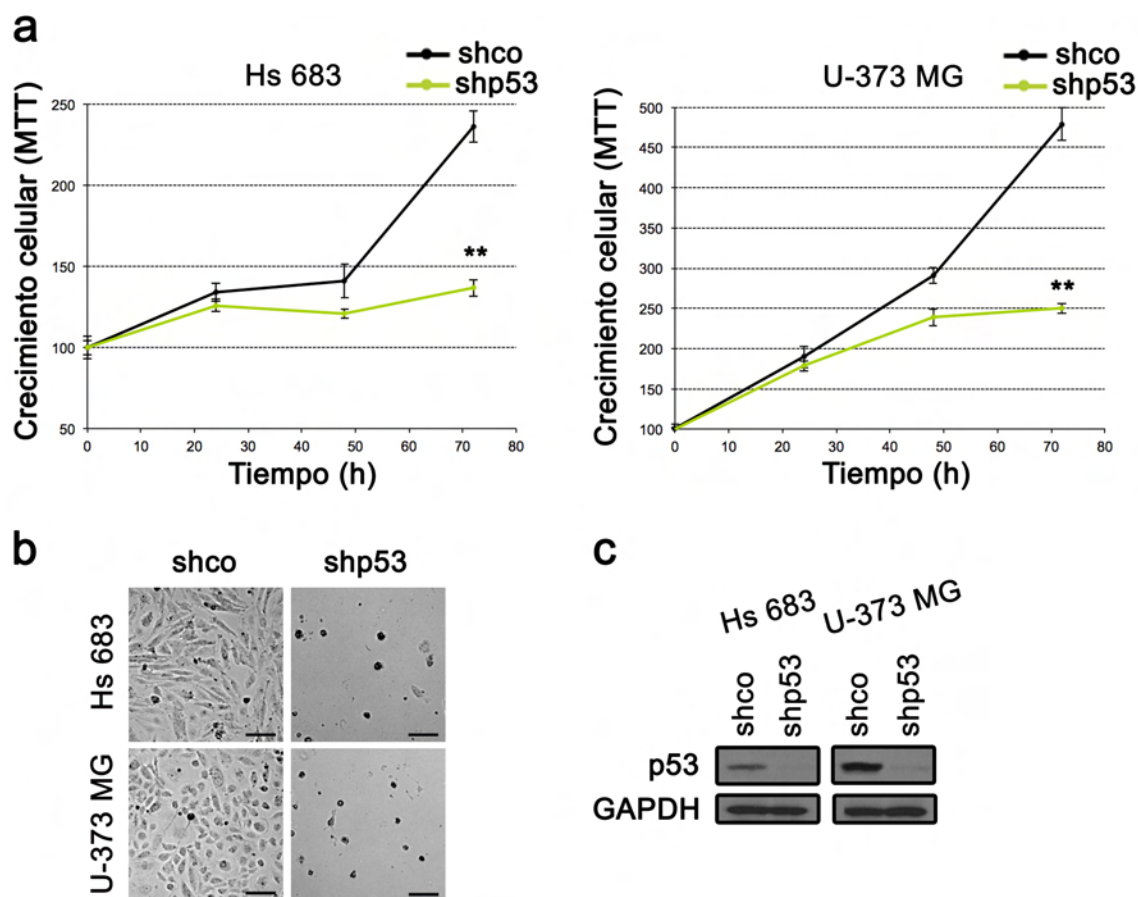


Figura R3. Efecto de la interferencia de p53 mutante en el crecimiento celular:

Líneas celulares Hs 683 y U-373 MG interferidas con shco y shp53. **(a)** Curva de crecimiento celular por MTT. Las barras de error representan la SD. **(b)** Fotografías en campo claro de las células (barra de escala 100 μ m). **(c)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53 y GAPDH como control de carga. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

En la **figura R3a** podemos observar a través de un ensayo de crecimiento con MTT, como la presencia de p53 mutante mantiene un crecimiento elevado, casi exponencial, de las células. La interferencia de p53 mutante produce un descenso en el crecimiento celular de forma estadísticamente significativa en ambas líneas celulares, un resultado que podemos evidenciar con las fotografías de las células (**Fig. R3b**).

A partir de cultivos en paralelo se comprobó la eficiencia del shRNA de interferencia usado contra p53. En la **figura R3c** se muestra como el interferente

shp53, en contraste con el shco, produce una clara bajada de la cantidad de proteína p53, validando el ensayo como demuestra el *western-blot*.

Los resultados obtenidos de este conjunto de experimentos nos permiten concluir que p53 mutante esta implicado en la proliferación de las líneas tumorales de glioblastoma Hs 683 y U-373 MG.

1.4. Papel de p53 mutante en líneas tumorales: supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.

Ya que p53 mutante podría estar ejerciendo una función en proliferación y supervivencia celular en células tumorales de glioblastomas, nos propusimos estudiar si la función de p53 mutante era esencial para las *cancer stem cell* (CSC). Las *cancer stem cell* (CSC) o células iniciadoras del tumor (*tumor-initiating cells*: TICs) parecen estar implicadas en el grado de malignidad del tumor y muchos autores las consideran responsables de iniciar y mantener el tumor, pudiendo estar involucradas en la recurrencia tumoral al ser más resistentes a tratamientos quimioterapéuticos ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

Para estudiar la función de p53 mutante en las CSC, pusimos a punto un cultivo definido para comprobar que los glioblastomas que queríamos ensayar se mantuviesen en este medio definido creciendo en suspensión generando esferas (neuroesferas) (descrito en Material y Métodos), en comparación con la línea celular tumoral de carcinoma de mama MDA-MB-231 (p53 mutante) que ya sabíamos que se comportaba como CSC-like ([Gargini et al., 2015](#)). Los datos de los cultivos indican que ciertamente la línea U-373 MG puede crecer formando neuroesferas y presenta marcadores *stem* prototípicos de glía como CD133 ([Singh et al., 2004](#)) donde el cultivo puede ser mantenido en pases formando esferas secundarias y terciarias (**Fig. R4**).

Los datos demuestran que la interferencia de p53 en la línea celular U-373 MG y en la línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 reduce de forma muy evidente el crecimiento de las esferas en medio CSC en contraste con el shRNA control (**Fig. R4a**).

El análisis bioquímico muestra como la presencia de p53 mutante aporta a estas células un alto nivel de actividad AKT, analizada mediante AKT pSer (**Fig. R4b**). De tal modo, la interferencia de p53 produce una bajada no solo en la actividad de AKT, si no que también provoca una activación de proteínas pro-apoptóticas como BIM o un aumento en la cantidad de caspasa 3 activa. De hecho, usando la línea celular MDA-MB-231, ya habíamos demostrado que el sistema de CSC es dependiente en parte de AKT-FoxO-BIM ([Gargini et al., 2015](#)).

Mediante el conteo de esferas podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las esferas generadas en condiciones control (shco) con respecto a las shp53 tanto en U 373-MG como en MDA-MB-231, donde la interferencia de p53 reduce en un rango de un 65-70% la formación de las esferas (Fig. R4c).

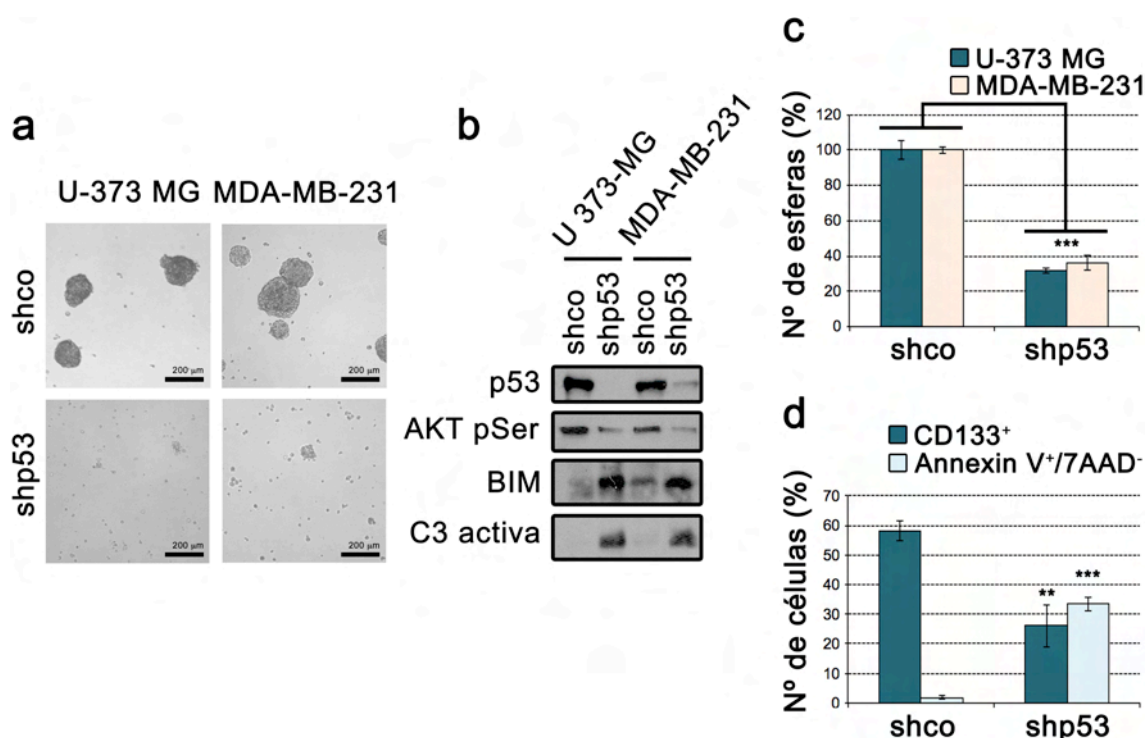


Figura R4. p53 mutante es necesario para la supervivencia y mantenimiento de las CSC en el tumor:

Líneas celulares U-373 MG y MDA-MB-231 interferidas con shco y shp53. (a) Fotografías de las esferas (barra de escala de 200 μm). (b) Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, AKT pSer, BIM, caspasa 3 activa (C3 activa). (c) Representación gráfica del porcentaje medio de esferas. Las barras de error representan la SD. (d) Representación gráfica del porcentaje de células CD113 positivas y Annexin V⁺/7AAD⁻ en la línea celular U-373 MG. Las barras de error representan la SD. ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 (prueba t-Student).

Cuando analizamos la proporción de CSC en las U-373 MG mediante el marcaje del receptor de membrana CD133, podemos ver que la eliminación de p53 mutante produce un cambio estadísticamente significativo en el porcentaje de número de células con fenotipo *stem*. Mientras que en situación control (shco) el 58% de las U-373 MG expresan en membrana el receptor CD133, cuando se interfiere p53 solo el 26% de las células expresan en membrana el receptor CD133 (Fig. R4d). Podemos concluir que p53 mutante es necesario para el mantenimiento de las células con fenotipo *stem*.

Por otro lado, al eliminar p53 mutante de las células U-373 MG se produce un incremento del 32% en el porcentaje de células apoptóticas que expresan Annexin V⁺/7AAD⁻ (Fig. R4d). De tal forma, p53 mutante se ve involucrado tanto en el

mantenimiento de la supervivencia celular como en el mantenimiento del fenotipo CSC.

En el mismo sentido, observamos que la función de p53 mutante sobre el mantenimiento de las CSC y la supervivencia celular no es exclusivo de modelos tumorales de glioblastomas (**Fig. R5**). Al analizar en la línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 la función p53 mutante podemos ver como la eliminación de p53 mutante impide el mantenimiento de las células con fenotipo *stem* marcadas como CD44⁺/CD42⁻ (**Fig. R5a**), incrementando la apoptosis (marcaje Annexin V⁺/7AAD⁻) (**Fig. R5b**), siendo ambos procesos dependientes de caspasas al poder ser bloqueados con el inhibidor de caspasa Q-VD-OPh (**Fig. R5a,b**).

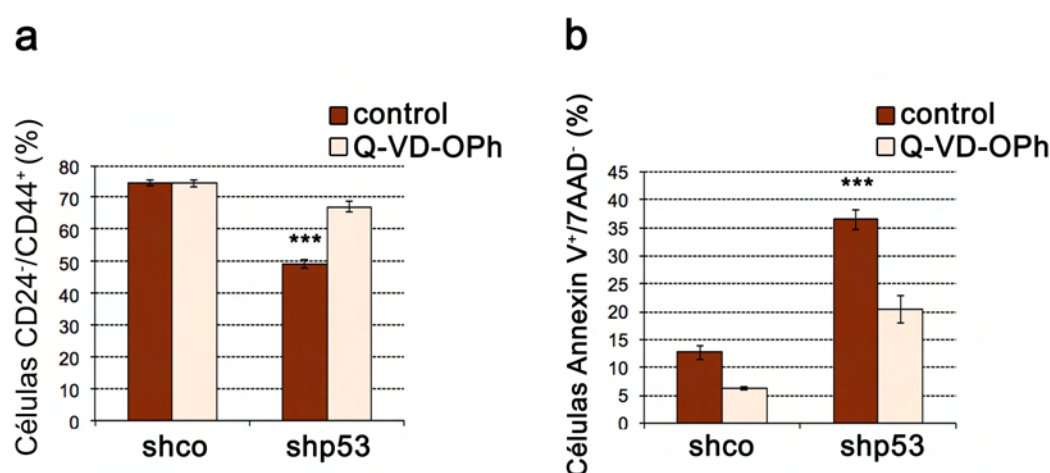


Figura R5. La eliminación de p53 mutante impide el mantenimiento del fenotipo stem produciendo una muerte dependiente de caspasa:

MDA-MB 231 con interferencia shco y shp53 (**a**) Representación gráfica del porcentaje medio de células CD24⁻/CD44⁺ tratadas en condiciones control y con inhibidor de caspasa (Q-VD-OPh 25 μ M) durante 72 horas. Las barras de error representan la SD. (**b**) Representación gráfica del porcentaje medio de células Annexin V⁺/7AAD⁻ tratadas en condiciones control y con inhibidor de caspasa (Q-VD-OPh 25 μ M) durante 72 horas. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

1.5. p53 mutante es esencial para el mantenimiento de la vía PI3K-AKT-FoxO-BIM.

La primera aproximación para poder determinar el papel de la vía PI3K/AKT en el mantenimiento de las CSC fue la eliminación farmacológica de la quinasa de lípidos, PI3K. Para ello, usamos la línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 capaz de formar mamoesferas *in vitro* y observamos como su crecimiento fue sensible al inhibidor de PI3K, LY294002 (Ly) (**Fig. R6a,b**). Este efecto es más prominente en las células crecidas en medios definidos (medio CSC), ya que la presencia de LY294002 en las células MDA-MB-231 que crecen en condiciones de cultivo adherido (DMEM 10% FBS) solo redujo el número total de células en un 32,7% en comparación con el 85% de reducción en cultivos de mamoesferas (**Fig. R6a,b**).

El ensayo de formación de colonias en agar blando es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la transformación celular *in vitro*, ya que las células transformadas tienen la capacidad de crecer y dividirse sin unirse a un sustrato (Hanahan and Weinberg, 2011). Por ello, consideramos interesante analizar dicha característica en nuestro sistema. De esta manera, observamos como la presencia del inhibidor LY294002 reduce fuertemente la capacidad de la línea MDA-MB-231 de formar colonias a partir de las mamoesferas subcultivadas en agar blando, pasando de 332 ± 26 colonias/placa a 167 ± 23 colonias/placa en presencia de LY294002 (**Fig. R6c**).

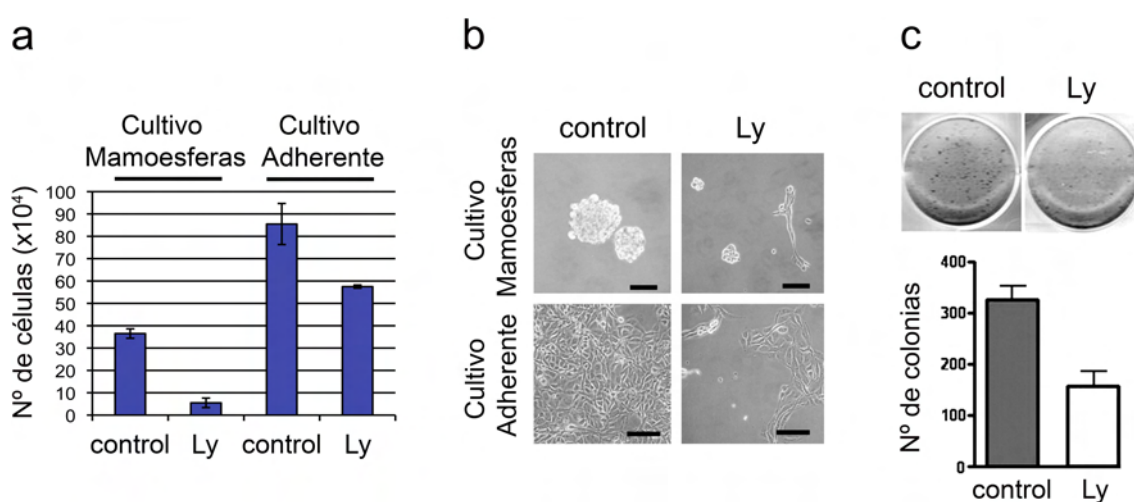


Figura R6. Implicación de la vía PI3K/AKT en el mantenimiento de las CSC en la línea celular MDA-MB-231:

(a y b) Células cultivadas en diferentes condiciones (mamoesferas o adherente), en presencia o ausencia de LY294002 (Ly) a 20 μ M. (a) Representación gráfica del número medio de células vivas. Las barras de error representan la SD. (b) Fotografías en contraste de fase (barra de escala de 50 μ m). (c) Imagen representativa del crecimiento independiente de anclaje (agar blando) de las células cultivadas en la presencia o ausencia de LY294002 (Ly) a 20 μ M durante 7 días. La gráfica muestra las medias y desviación estándar (SD) del número de colonias observadas en tres experimentos independientes.

Se ha descrito que la proteína pro-apoptótica BIM puede promover la muerte celular producida por la falta de adhesión (Reginato et al., 2003). Nosotros hemos observado como en las células epiteliales mamarias MCF-10A (células inmortalizadas, pero no transformadas) la morfología de las células crecidas en condición de cultivo adherente (medio HS, descrito en Material y Métodos) se modificó ligeramente al eliminar BIM (**Fig. R7a**). Mientras que la formación de mamoesferas en situación control (shGFP) para estas células epiteliales resulta baja, podemos observar como la reducción de la expresión de BIM mejoró el crecimiento en mamoesferas en suspensión (**Fig. R7a,b**).

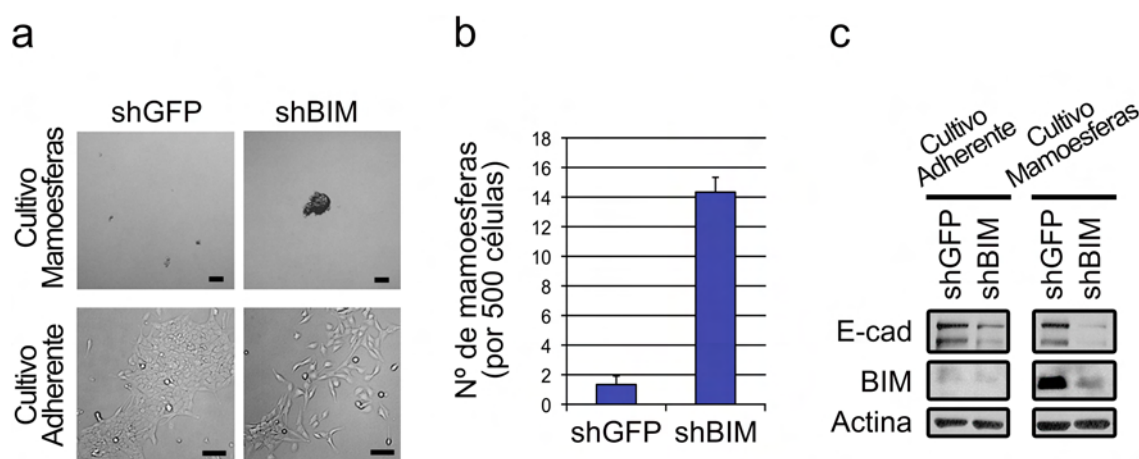


Figura R7. La falta de BIM permite el transito a fenotipo mesenquimal y el crecimiento de las CSC formando mamoesferas:

Línea epitelial mamaria MCF-10A crecidas en diferentes condiciones de cultivo (mamoesferas o adherente) con interferencia de BIM (shBIM) o shGFP como control. **(a)** Fotografías en contraste de fase (barra de escala de 50 μ m). **(b)** Representación gráfica del número medio de mamoesferas secundarias. Las barras de error representan la SD. **(c)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra E-cadherina (E-cad), BIM y Actina como control de carga.

En los extractos de estas células podemos observar como se produce un aumento en la cantidad de BIM cuando las células son cultivadas en mamoesferas en comparación con los cultivos adheridos (**Fig. R7c**). Además, la eliminación de BIM produce una importante bajada en la proteína de marcaje epitelial E-cadherina, siendo este resultado más evidente en cultivos sin adhesión formando mamoesferas (**Fig. R7c**).

Como ya hemos mencionado, hemos descrito recientemente que la vía AKT-FoxO-BIM es esencial para la supervivencia celular y el mantenimiento de las células con fenotipo de CSC en modelos tumorales de carcinoma de mama ([Gargini et al., 2015](#)). Al observar que la eliminación de p53 mutante aumenta la expresión de BIM a la vez que disminuye la actividad de AKT (**Fig. R4b**), nos planteamos analizar si p53 mutante podría estar utilizando en glioblastomas un mecanismo similar al que ya hemos descrito para el mantenimiento de las CSC.

Para ello, comprobamos si la eliminación de BIM mediante la interferencia (shBIM) podría restablecer los niveles normales de caspasa 3 activa. De esta forma, las células U-373 MG se interfirieron primero con retrovirus que contienen shGFP (control) y shBIM y después se interfirieron con los correspondientes lentivirus para shp53 y shco (**Fig. R8**).

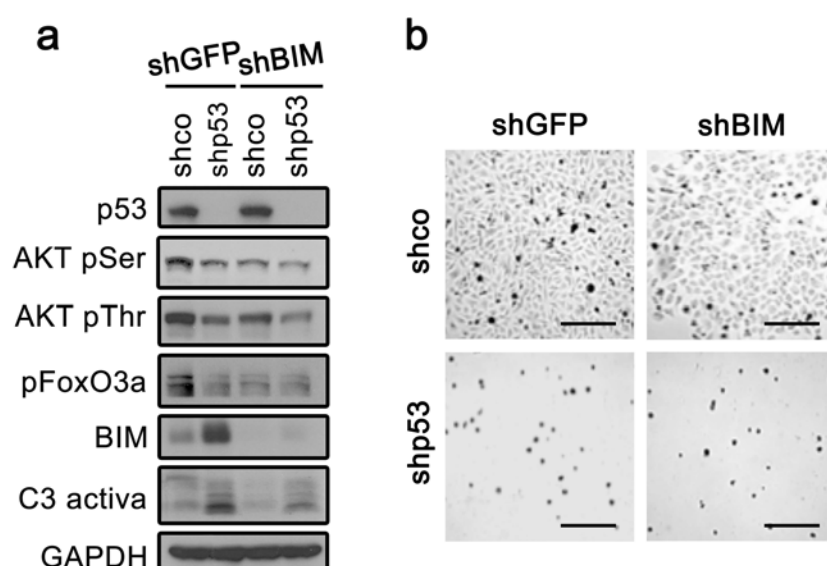


Figura R8. p53 mutante es esencial para mantener la vía AKT-FoxO-BIM:

La línea celular U-373 MG interferida con shco y shp53 en células previamente interferidas con shGFP (control) y shBIM. (a) Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, AKT pSer, AKT pThr, pFoxO3a, BIM, caspasa 3 activa (C3 activa) y GAPDH como control de carga. (b) Fotografías de las células en campo claro (barra de escala 200 µm).

Después de 6 días de interferencia con shco/shp53 se obtuvieron los extractos celulares y se analizaron por *western-blot*. A partir de estos datos podemos observar como la interferencia de p53 produce una bajada en la actividad de AKT mostrando menor cantidad de AKT pSer y AKT pThr, disminuyendo en paralelo la cantidad de pFoxO3a lo que correlaciona con promover un aumento en BIM. Observamos como el aumento en BIM activa mecanismos de muerte dependiente de caspasa medidos a través del aumento en la cantidad de caspasa 3 activa (**Fig. R8a**). Sin embargo, la eliminación de BIM, que resulta bastante eficiente como podemos observar (**Fig. R8a**), si bien disminuye la cantidad de caspasa 3 activa aproximadamente en un 43% no es suficiente para evidenciar un rescate en la supervivencia celular (**Fig. R8b**).

Estos datos sugieren de forma concluyente que p53 es esencial para el mantenimiento de la vía AKT-FoxO-BIM, aunque no es la única vía de apoptosis disparada por la falta de p53 mutante.

1.6. Análisis de la función p53 mutante en GBs: supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.

Fisiológicamente resulta relevante analizar la función de p53 mutante no solo en líneas tumorales establecidas si no también en explantes de tumores humanos. Por ello, decidimos estudiar el papel de p53 mutante en la capacidad de crecer en neuroesferas, la supervivencia celular y el mantenimiento de las CSC en una serie de glioblastomas procedentes de tumores humanos que presentan de forma endógena p53 mutante (GB4, GB18 y GB19, como hemos demostrado en la **figura R2b**).

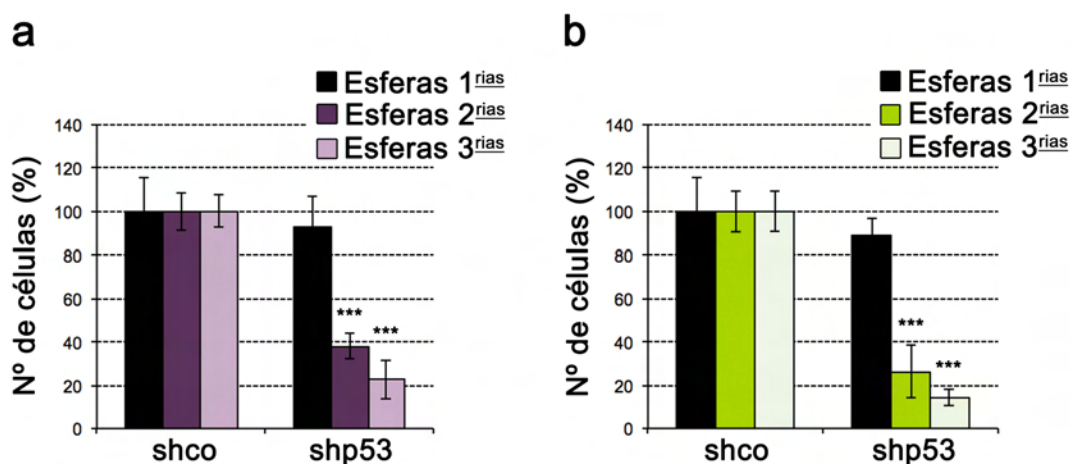


Figura R9. GBs en esferas primarias, secundarias y terciarias al interferir shp53

Representación gráfica del porcentaje medio del número de células en explantes procedentes de tumores de glioblastomas humanos (a) GB4. (b) GB18. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

En primer lugar, realizamos un ensayo de crecimiento en esferas donde se cuantificó el número de células vivas mediante el uso de Trypan Blue en los glioblastomas procedentes de tumores humanos GB4 y GB18 al eliminar p53. Observamos que en las esferas primarias (5 días de interferencia) todavía no se observa diferencias entre las shco y shp53 (**Fig. R9a,b**). Sin embargo, tanto en las esferas secundarias (10 días de interferencia) como en las esferas terciarias (15 días de interferencia) se observan diferencias significativas en el número de células con respecto a sus controles (**Fig. R9a,b**).

De tal modo, identificamos que en esferas secundarias y terciarias ya se obtiene de forma evidente el efecto de la eliminación de p53, tomándose este experimento como control para realizar todos los siguientes experimentos en esferas secundarias.

A continuación, se realizaron esferas secundarias (10 días de interferencia) en los GBs (GB4, GB18 y GB19). Como demuestra el *western-blot*, la interferencia de p53 con el uso de shRNA de interferencia lentiviral shp53 produce una clara bajada de la cantidad de proteína p53, en contraste con el shRNA control (shco) (**Fig. R10a**), correlacionando de forma clara con la pérdida en la capacidad de los GBs del crecimiento en neuroesferas (**Fig. R10b**). Disminuyendo a más de la mitad el número de neuroesferas formadas, siendo éstas extremadamente pequeñas como se puede concluir por el descenso en más del 90% en el número de células (**Fig. R10c,d**).

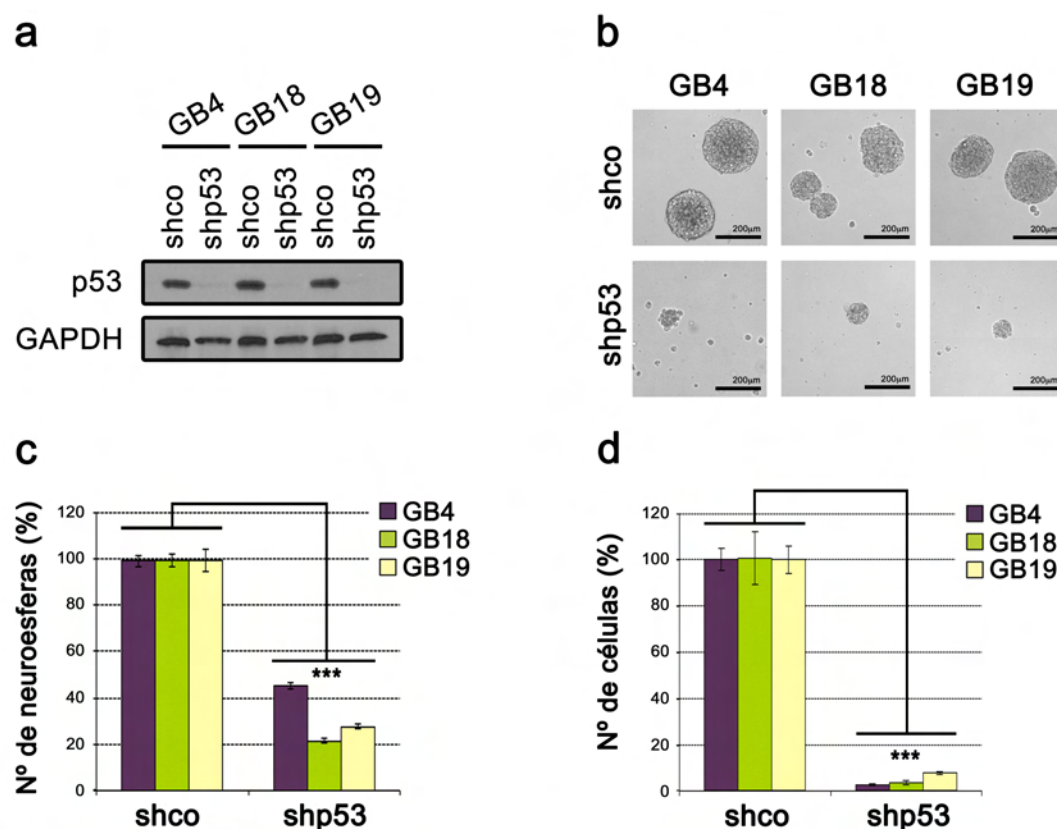


Figura R10. Efecto de la interferencia de p53 mutante en GBs:

Explantos procedentes de tumores de glioblastomas humanos (GB4, GB18 y GB19) interferidos con shp53 y shco. **(a)** Análisis de extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53 y GAPDH como control de carga. **(b)** Fotografías de las neuroesferas controles y las shp53 (barra de escala de 200 μ m). **(c)** Representación gráfica del porcentaje medio de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. **(d)** Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

Al observar que los tres explantes tienen un comportamiento similar, para simplificar la experimentación tomamos dos de estos tres GBs y analizamos la viabilidad celular cuando se elimina p53. Observamos como se produce un aumento del marcaje apoptótico Annexin V⁺/7AAD⁻ pasando de un 4-8% de células que lo expresan en condición control a un 68-56% (respectivamente GB4, GB18) con la eliminación de p53 (**Fig. R11a**), concluyendo que p53 mutante es necesario para la viabilidad de los GBs.

Cuando estudiamos el papel de p53 mutante en el mantenimiento del porcentaje de CSC en los GBs mediante marcadores de membrana característicos y altamente descritos como CD133 y CD44 ([Pietras et al., 2014](#); [Singh et al., 2004](#)), observamos como la interferencia de p53 disminuye el porcentaje de células CD133⁺ pasando de un 72-82% en situación control a un 22-12% (GB4 y GB18 respectivamente) (**Fig. R11b**). Del mismo modo, el porcentaje de células CD44⁺ se ve disminuido al eliminar p53 pasando de 61-60% al 40-32% (GB4 y GB18 respectivamente) (**Fig. R11c**).

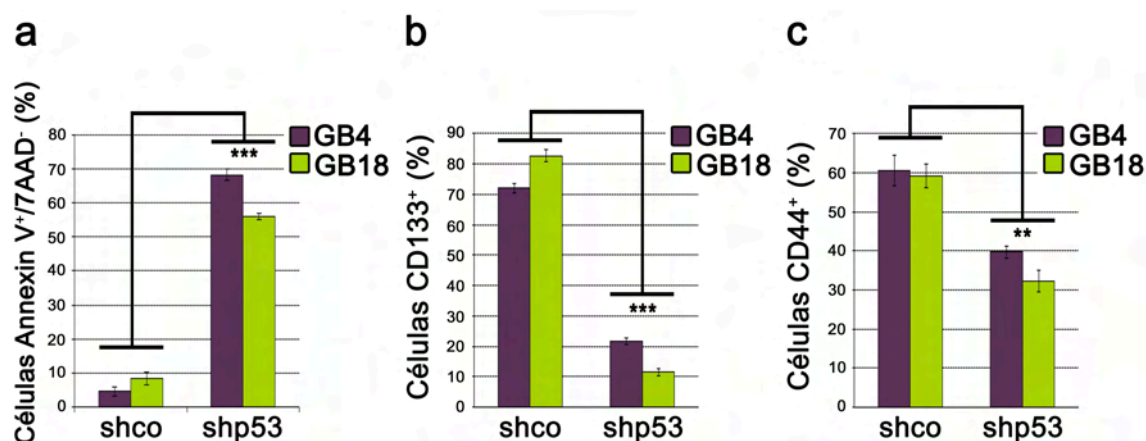


Figura R11. Efecto de la interferencia de p53 mutante en la muerte y el mantenimiento del fenotipo stem en los GBs:

Explantos de pacientes con glioblastomas GB4 y GB18 interferidos con shp53 y shco analizados con marcadores de membranas por citometría de flujo. (a) Porcentaje medio de células que expresan Annexin V⁺/7AAD⁻. Las barras de error representan la SD. (b) Porcentaje medio de células que expresan el receptor CD133. Las barras de error representan la SD. (c) Porcentaje medio de células que expresan el receptor CD44. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

Concluyendo en este apartado que p53 mutante es necesario para el mantenimiento y la viabilidad de las CSC presentes en los explantes procedentes de tumores de glioblastomas humanos.

1.7. Análisis de la función de mutantes concretos de p53 en supervivencia, proliferación y mantenimiento de las CSC.

Todos los datos anteriores se basan en la estrategia de eliminar p53 en aquellas células ya tumorales que presentan p53 mutante de forma endógena. Sin embargo, en algunos casos la acumulación de otras mutaciones en distintos fondos tumorales podría hacer que las conclusiones no fuesen completamente correlacionables con la actividad mutante de p53.

Para reforzar esta hipótesis inicial, utilizamos una estrategia complementaria que consideramos más específica. Se trata de introducir exclusivamente un mutante de p53 en unas células prácticamente silvestres como son los astrocitos primarios humanos (Human Astrocytes, Ref.: #1800, ScienCell). De este modo, solo tenemos el efecto de los mutantes de p53 y eliminamos el efecto de otros oncogenes. Estos astrocitos primarios humanos fueron transformados usando la sobre-expresión de dos mutantes distintos de p53, el R175H y el R273H (Muller and Vousden, 2013) y posteriormente se comprobó parámetros oncogénicos como la supervivencia, proliferación y su capacidad para generar neuroesferas (Fig. R12).

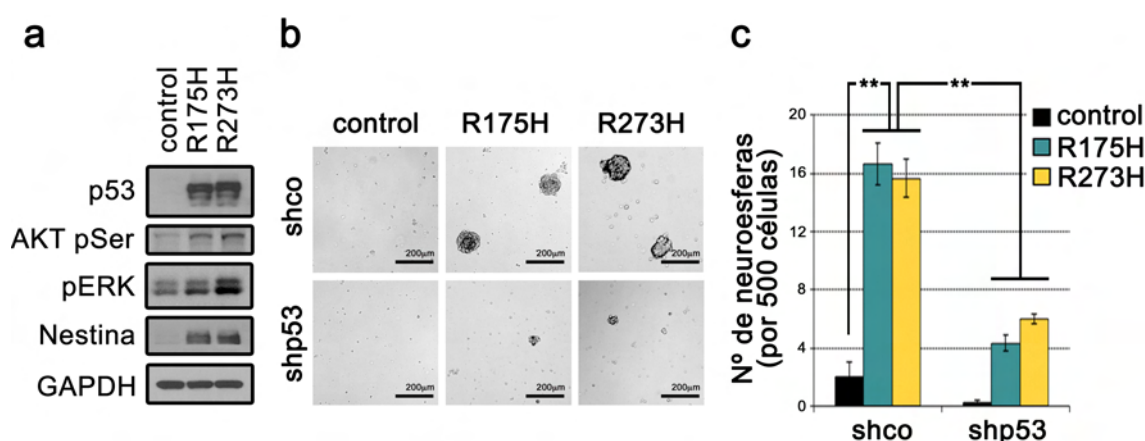


Figura R12. p53 mutante transforma astrocitos y promueve la supervivencia y el crecimiento de las CSC:

Astrocitos primarios humanos con sobre-expresión de p53 mutante R175H y R273H (a) Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, AKT pSer, pERK, Nestina y GAPDH como control de carga. (b) Fotografías de las neuroesferas (barra de escala de 200 µm) con interferentes shco y shp53. (c) Representación gráfica del número medio de neuroesferas con interferentes de shco y shp53. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

Como demuestran los datos de la **figura R12a**, los astrocitos transformados con p53 R175H o p53 R273H tienen un alto nivel de expresión de p53, lo que genera un aumento en la actividad de proteínas implicadas en vías de supervivencia y proliferación celular como AKT pSer y pERK. Los astrocitos transformados con estos mutantes de p53 R175H y R273H, muestran un aumento en la cantidad del marcador de CSC Nestina. La expresión alta de este marcador *stem* correlaciona con la capacidad de generar neuroesferas, pudiendo observar como ambos mutantes de p53 originan un aumento en el número de neuroesferas de forma estadísticamente significativa, después de 7 días en cultivo CSC (**Fig. R12b,c**). Como comprobación de que el efecto es debido a la sobre-expresión de los mutantes, podemos observar que con la posterior interferencia de p53 se pierde casi toda la capacidad de crecimiento en suspensión de las esferas (**Fig. R12b,c**).

Para comprobar si este efecto pudiera ser generalizable a otros modelos celulares, hemos utilizado las células inmortalizadas de epitelio mamario MCF 10A. Del mismo modo, al sobre-expresar p53 mutante R273H (**Fig. R13**) observamos que el nivel basal de generación de mamoesferas, que es bajo para estas células inmortalizadas pero poco transformadas, se incrementa notablemente tanto en el número de mamoesferas como en el número de células (del 250% y del 320% respectivamente), siendo, por tanto, un efecto no exclusivo del tipo modelo celular utilizado.

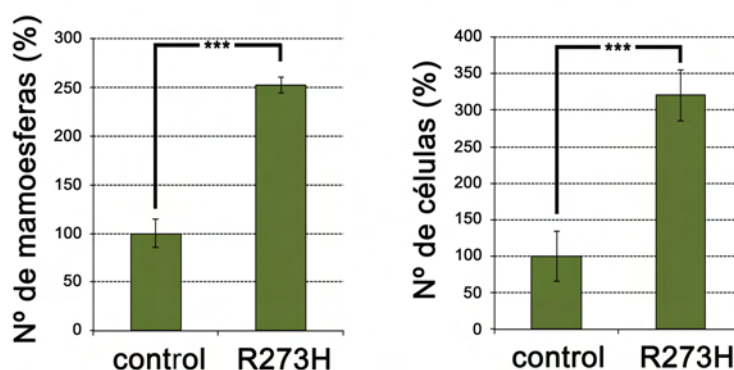


Figura R13. p53 mutante incrementa el crecimiento en suspensión en MCF 10A:

Línea celular MCF 10A con sobre-expresión de p53mutante R273H. Representación gráfica del porcentaje medio del número de mamoesferas y porcentaje medio de número de células. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

De tal forma, podemos concluir que mutantes específicos de p53 generan una transformación oncogénica tanto en astrocitos como en células epiteliales de mama, generando una mayor supervivencia y favoreciendo el crecimiento en condiciones CSC.

2. Efecto de las mutaciones de p53. Elementos regulados por la transformación.

2.1. Análisis de marcadores que correlacionan con la transformación mediada por p53.

Para estudiar con más detalle que elementos regulados por la actividad oncogénica de p53 podían ser esenciales en el mantenimiento de las CSC, decidimos primero realizar una búsqueda bibliográfica de posibles dianas ya descritas. Así, diferentes mutaciones de p53 correlacionan con un conjunto de genes que están asociados al crecimiento tumoral como CD44 (Godar et al., 2008), integrina $\beta 1$ (Muller et al., 2009), integrina $\alpha 6$ (Muller et al., 2009), EGFR (Muller et al., 2009; Wang et al., 2013), WIP (Staub et al., 2009), etc.

Nuestro primer objetivo fue correlacionar alguna de estas proteínas en distintas líneas celulares teniendo en cuenta el estado de p53. Para ello hemos elegido 17 líneas celulares establecidas de distintos tipos de tumores (glioblastoma, mama, colon y ovario) y 5 tipos de células provenientes de explantes de tumores de glioblastomas humanos (GBs). En primer lugar, se clasificaron las distintas líneas celulares en dos grupos dependiendo del estado de p53, WT o mutante. Posteriormente, se cuantificó a través de *western-blot* la cantidad de proteína CD44, Integrin $\beta 1$ y WIP que presentaban las distintas células. A continuación, se analizó si existían diferencias en la cantidad de dichas proteínas entre la población de células p53 WT o p53 mutante a través de una prueba t-Student donde se obtuvo un determinado p-valor.

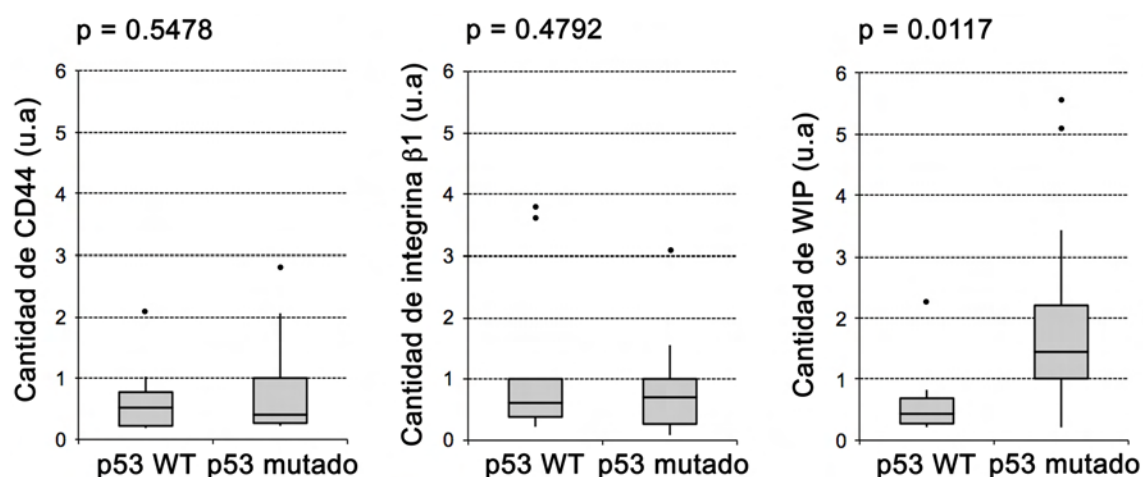


Figura R14. Correlación de la presencia de p53 mutante con la cantidad de CD44, integrina $\beta 1$ y WIP:

17 líneas celulares y 5 GBs fueron analizados y cuantificados su cantidad de CD44, integrina $\beta 1$ y WIP con respecto al estado de p53, WT (*wild type*) o mutante. Donde p es el p-valor (prueba t-Student).

Aunque el número de líneas celulares utilizado es relativamente pequeño, nuestros datos iniciales sugieren que mientras la cantidad de CD44 e integrina $\beta 1$ no

llegan a ser significativamente distinta dependiendo del estado de p53 (WT o mutante), sorprendentemente existe una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de WIP, obteniendo un p-valor de $p = 0.0117$ (**Fig. R14**). De tal manera, las células que presentan p53 mutante correlacionan con una mayor cantidad de WIP y las células p53 WT correlacionan con una baja cantidad de WIP.

2.2. Correlación entre p53 mutante y WIP.

Para tratar de demostrar la correlación positiva entre WIP y p53 mutante hicimos dos aproximaciones complementarias. Por un lado, comprobamos si la sobre-expresión de p53 mutante en astrocitos primarios humanos afecta a WIP y por otro lado, si la eliminación de p53 en células que presentan de forma endógena p53 mutante reduce la cantidad de WIP.

Así, nuestros datos demuestran que la sobre-expresión de p53 mutante R273H en astrocitos primarios humanos genera un claro aumento en la cantidad de WIP (**Fig. R15**).

De forma complementaria, los extractos celulares de los GBs con p53 mutante endógeno (GB4, GB18 y GB19) utilizados en la **figura R10a**, muestran una importante expresión de WIP que es reducida drásticamente al eliminar p53 (**Fig. R15**).

Como recordatorio podemos añadir que la sobre-expresión de p53 mutante produce un incremento en la capacidad de formar neuroesferas (**Fig. R12**), al igual que la interferencia de p53 en los GBs disminuye dicha capacidad (**Fig. R10**).

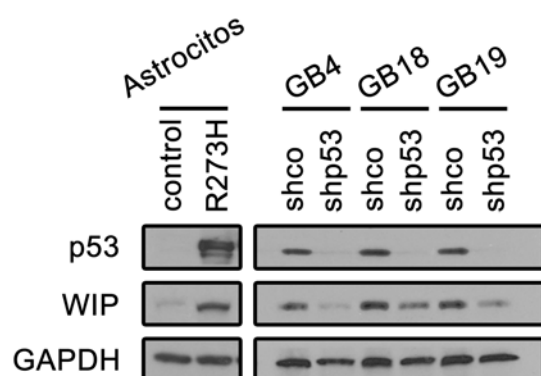


Figura R15. Correlación de p53 mutante con WIP:

Astrocitos primarios humanos con sobre-expresión de p53 mutante R273H y explantes procedentes de tumores de glioblastomas humanos (GB4, GB18 y GB19) interferidos con shp53. Análisis de extractos totales de proteínas por western-blot con anticuerpos específicos contra p53, WIP y GAPDH como control de carga.

2.3. p53 mutante realiza parte de su función oncogénica a través de WIP.

Como hemos descrito anteriormente, p53 mutante regula propiedades oncogénicas como la formación de esferas y el mantenimiento de las CSC. A su vez, tanto la eliminación como la sobre-expresión de p53 mutante correlacionan drásticamente con la reducción y el aumento de la cantidad de WIP, respectivamente.

La siguiente pregunta que surge, es si estas propiedades oncogénicas de p53 mutante se deben al efecto que genera p53 mutante sobre WIP. Llegados a este punto, decidimos analizar el efecto de sobre-expresar WIP en células en las que posteriormente eliminamos p53 para analizar si la presencia de WIP es suficiente para desempeñar la capacidad oncogénica que se pierde al eliminar p53 mutante.

Para ello se utilizó el glioblastoma GB4 al que se le sobre-expresó WIP-GFP y GFP como control mediante el uso de lentivirus. A las 24 horas, se interfirió con shRNA control (shco) y shp53 y se cultivaron las células realizando esferas secundarias (10 días de interferencia y selección) (**Fig. R16**). Sorprendentemente, el potencial oncogénico de GB4 al sobre-expresar WIP-GFP no fue reducido significativamente al eliminar p53 como ocurrió al expresar solamente GFP (**Fig. R16a**), obteniendo un rescate estadísticamente significativo tanto en el número de neuroesferas como en el número de células (**Fig. R16b,c**). Con estos datos podríamos concluir que p53 mutante realiza parte de su función oncogénica a través de WIP, siendo WIP suficiente para desempeñar el papel de p53 mutante, al menos en gran parte, cuando este es eliminado.

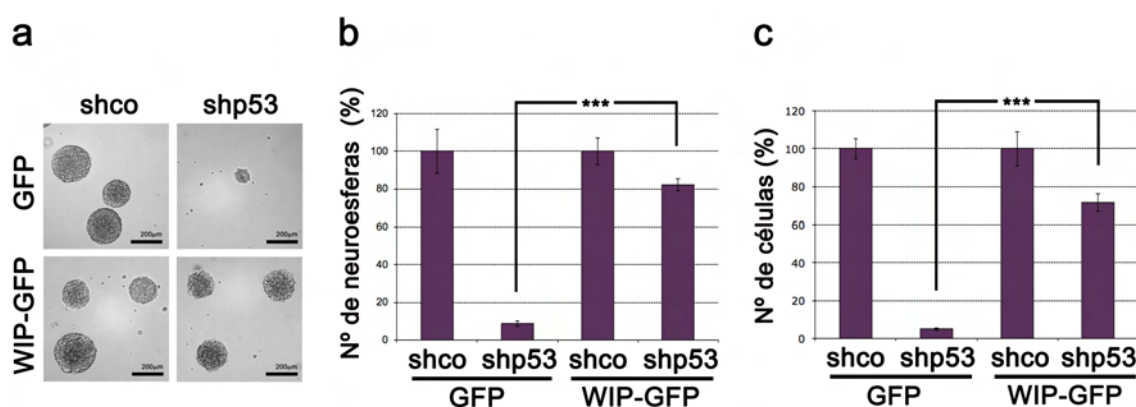


Figura R16. WIP restablece la formación de neuroesferas en GB4 cuando p53 mutante es eliminado:

Explantos procedentes de tumor de glioblastoma humano GB4 interferido con shco, shp53 en células con sobre-expresión de WIP-GFP y GFP como control de sobre-expresión. (a) Fotografías de las neuroesferas (barra de escala de 200 μm). (b) Representación gráfica del porcentaje medio de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. (c) Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

A continuación, nos plantamos analizar si esta dependencia de la función de p53 mutante sobre WIP para realizar partes de sus funciones oncogénicas no es exclusiva de glioblastomas. Para ello, utilizamos la línea de carcinoma de mama MDA-MB-231, obteniendo resultados similares, donde podemos ver que el efecto obtenido en la generación de mamoesferas y en el número de células cuando se interfiere p53 mutante es revertido con la sobre-expresión de WIP-GFP (**Fig. R17a,b**).

Quisimos establecer la importancia fisiológica de este proceso *in vivo* para ello utilizamos un modelo de xenotrasplantes de ratones desnudos (*Nude*) (**Fig. R17c,d**).

En primer lugar hemos visto como la eliminación de p53 mutante reduce el crecimiento de los tumores *in vivo* (**Fig. R17c,d**). Además, observamos como la sobre-expresión de WIP restablece el crecimiento de tumores *in vivo* en los que se ha eliminado p53 (shp53). De tal modo, se puede ver como los tumores WIP-shp53 son significativamente mayores que los tumores GFP-shp53 (**Fig. R17c,d**).

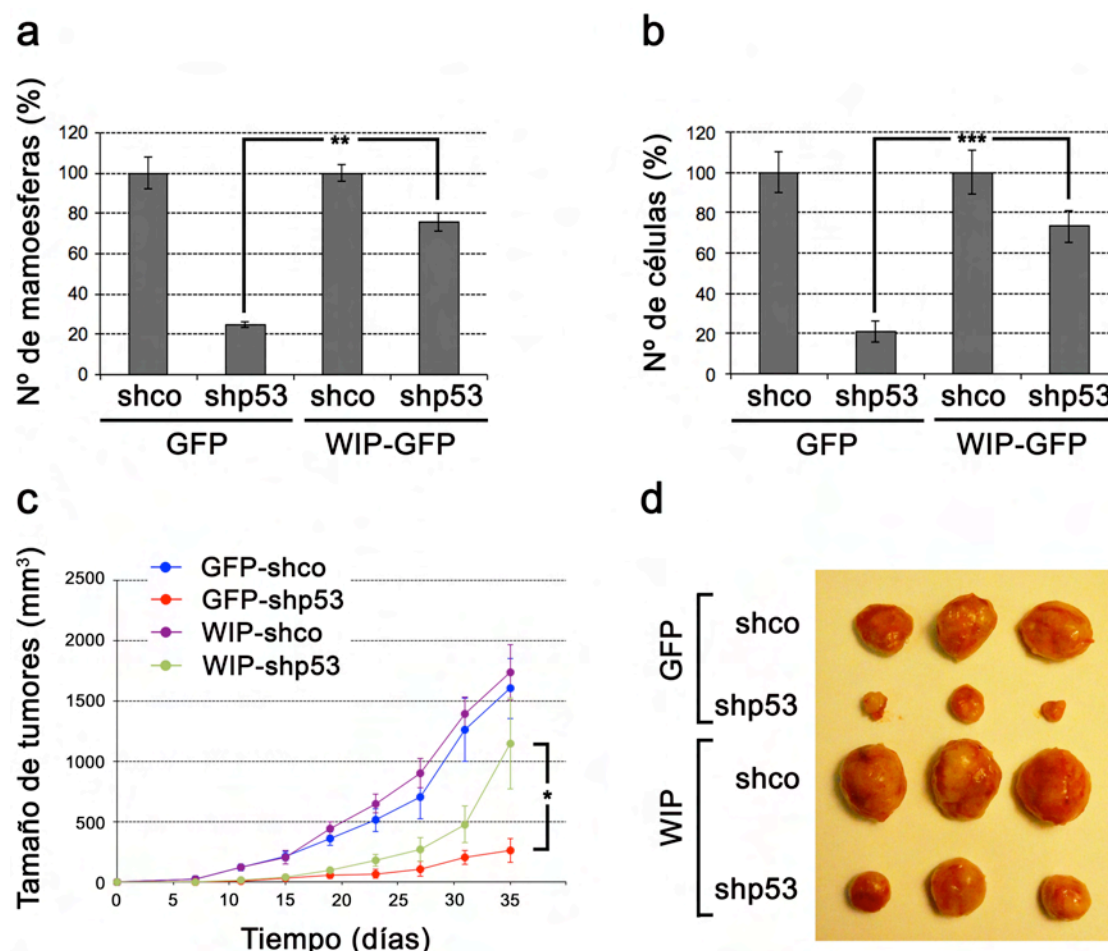


Figura R17. WIP restablece la formación de mamoesferas y el crecimiento de tumores *in vivo* cuando p53 mutante es eliminado:

MDA-MB-231 interferido con shco, shp53 en células con sobre-expresión de WIP-GFP y GFP como control de sobre-expresión. (a) Representación gráfica del porcentaje medio del número de mamoesferas. Las barras de error representan la SD. (b) Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. (c) Representación gráfica del tamaño tumoral (mm³) con respecto al tiempo de tumores generados en 8 ratones *Nude* con la línea MDA-MB-231. Las barras de error representan el SEM. (d) Fotografía de 3 tumores representativos de cada grupo. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

Estos dos grupos de datos sugieren robustamente que, al menos en los modelos analizados, la actividad oncogénica de p53 mutante pasa indefectiblemente en gran parte por WIP tanto *in vitro* como *in vivo*.

3. Mecanismos por los cuales p53 mutante y WIP llevan a cado su función oncogénica.

3.1. p53 mutante y WIP controlan el fenotipo tumoral a través de YAP/TAZ.

En este nuevo capítulo, nos planteamos estudiar y tratar de identificar que elementos podrían estar de forma común en la vía de p53 mutante y WIP para la regulación del fenotipo y las propiedades de las CSC.

Para ello, interferimos p53 (shp53) y WIP (shWIP) por medio de shRNA de expresión lentiviral en los glioblastomas (GB4, GB18 y GB19) y analizamos marcadores de fenotipo *stem* como Nestina y las proteínas YAP/TAZ, previamente descritas como necesarias para mantener la auto-renovación de las células con características de *stem* de un tumor (Bhat et al., 2011; Cordenonsi et al., 2011).

En primer lugar, detectamos que en ambos modelos tumorales, glioblastomas y carcinoma de mama en condiciones de cultivo sin adhesión formando esferas en medio CSC, se expresa mayoritariamente TAZ, siendo el nivel de YAP casi indetectable, aunque el nivel de YAP se pone de manifiesto en condiciones de crecimiento en medios con alto suero y adhesión a plástico (datos no mostrados).

A partir de los GBs interferidos y sus controles, obtuvimos los extractos totales de las esferas secundarias formadas tras 10 días de interferencia y selección. Los *western-blots* muestran como la eliminación de p53 mutante produce una reducción tanto en p53 como en la proteína WIP endógena y que el shWIP produce una clara interferencia en la producción de la proteína WIP, comparada con los correspondientes control de cada uno de los tres glioblastomas (Fig. R18a). Esto demuestra un correcto funcionamiento y especificidad de los shRNA utilizados.

Como muestra el *western-blot*, la eliminación de p53 reduce drásticamente en los tres glioblastomas la cantidad de TAZ y Nestina en comparación con el shco. Del mismo modo, la interferencia de WIP reduce drásticamente en los tres glioblastomas la cantidad de TAZ y parcialmente la de Nestina (Fig. R18a).

Sorprendentemente, en ambos casos tanto la eliminación de WIP como la eliminación de p53 mutante reduce severamente la capacidad de estos GBs de crecer en CSC (Fig. R18b), disminuyendo de forma estadísticamente significativa tanto el número de neuroesferas como el número de células (Fig. R18c,d).

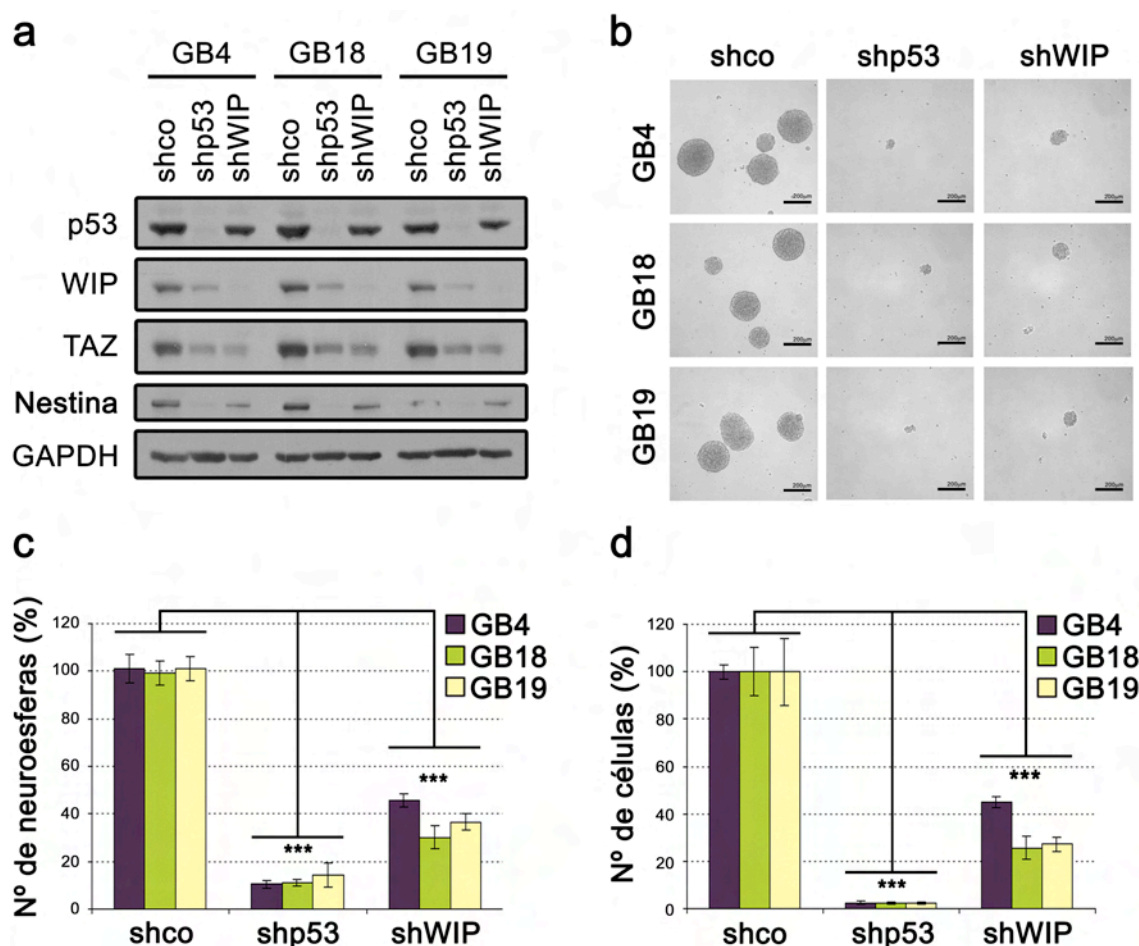


Figura R18. La eliminación de p53 mutante o de WIP compromete el crecimiento en neuroesferas y el mantenimiento de las CSC en los GBs:

Explantos procedentes de tumores de glioblastomas humanos GB4, GB18, GB19 interferidos con shco, shp53 y shWIP. (a) Análisis de extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, WIP, TAZ, Nestina y GAPDH como control de carga. (b) Fotografías de las neuroesferas (barra de escala de 200 µm). (c) Representación gráfica del porcentaje medio de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. (d) Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

En paralelo, realizamos un análisis de un experimento complementario que sería la sobre-expresión de WIP cuando p53 es eliminado (según se describe en la **figura R16**). Para ello, analizamos bioquímicamente los extractos celulares de las neuroesferas y observamos como en el GB4 la eliminación de p53 mutante reduce tanto la cantidad de WIP como la cantidad de TAZ y Nestina y que los niveles de estas proteínas son recuperados con la sobre-expresión de WIP-GFP (**Fig. R19a**). A su vez, cuando se cuantifica la cantidad de TAZ podemos observar como la sobre-expresión de WIP-GFP produce una recuperación en el nivel de proteína estadísticamente significativa en comparación con el control de interferencia de p53 sin sobre-expresión de WIP (**Fig. R19b**).

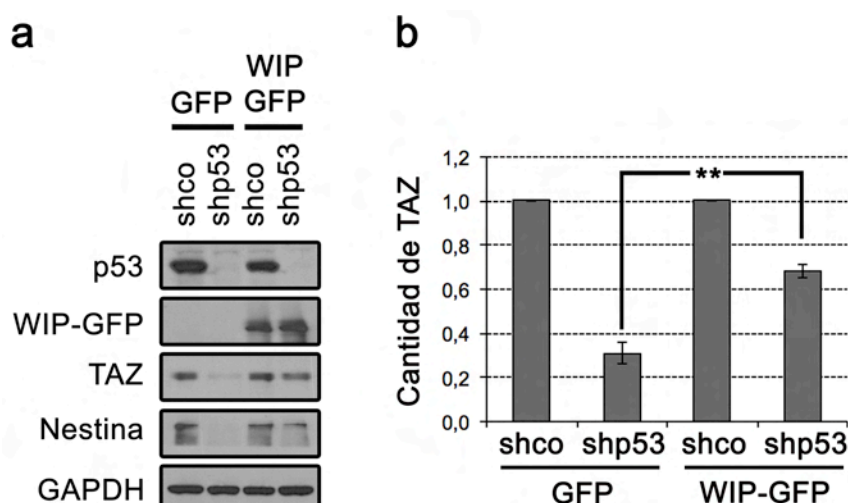


Figura R19. La bajada en la cantidad de TAZ producida por la eliminación de p53 mutante es restablecida con la sobre-expresión de WIP-GFP en glioblastomas.

Explante procedente de tumor de glioblastoma humano GB4 interferido con shco, shp53 en células con sobre-expresión de WIP-GFP y GFP como control de sobreexpresión. **(a)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, WIP, TAZ y Nestina y GAPDH como control de carga. **(b)** Representación gráfica de la cuantificación de la cantidad de proteína de TAZ normalizada con respecto a sus shco. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$; (prueba t-Student).

Todos estos datos apoyan firmemente la hipótesis de que WIP es regulado por p53 mutante y que posteriormente WIP utiliza a TAZ como mecanismo principal para la capacidad de crecimiento y fenotipo *stem* en gliomas.

Para tratar de ver si esta hipótesis de trabajo es generalizable, utilizamos el modelo tumoral de carcinoma de mama como abordaje complementario.

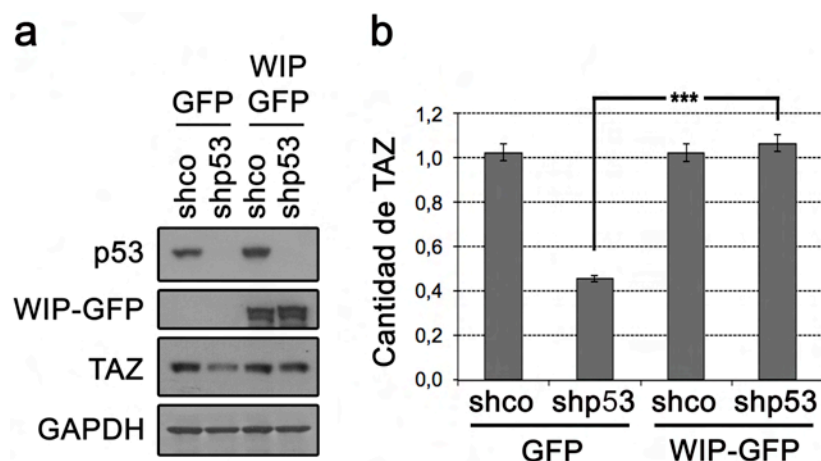


Figura R20. La bajada en la cantidad de TAZ producida por la eliminación de p53 mutante es restablece con la sobre-expresión de WIP-GFP en MDA-MB-231.

Línea celular de carcinoma de mama MDA-MB-231 interferida con shco, shp53 en células con sobre-expresión de WIP-GFP y GFP como control de sobreexpresión. **(a)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, WIP, TAZ y GAPDH como control de carga. **(b)** Representación gráfica de la cuantificación de la cantidad de proteína de TAZ normalizada con respecto a sus shco. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

Al analizar bioquímicamente un experimento idéntico al de la **figura R17**, obtuvimos resultados similares a partir de los extractos celulares de las mamoesferas

del carcinoma de mama MDA-MB-231. Observamos de nuevo como la sobreexpresión de WIP-GFP recupera los niveles de TAZ reducidos por la presencia que genera la interferencia de p53 (**Fig. R20a,b**).

De nuevo, de ambos grupos de resultados obtenidos de dos modelos tumorales muy diferentes, podemos concluir que gran parte de la capacidad de mantener el fenotipo y propiedades de las CSC que ejerce p53 mutante lo hace a través de WIP y posteriormente, WIP sobre TAZ. Siendo este mecanismo no exclusivo de glioblastomas, pudiéndose observar en otros modelos tumorales.

3.2. Análisis del la regulación de p53 mutante sobre WIP y TAZ.

En este siguiente apartado nos propusimos discernir sobre cómo p53 mutante podría estar ejerciendo su función oncogénica a través del control de las proteínas WIP y TAZ. Para ello, decidimos analizar si existía un control génico sobre la expresión de mRNA y/o un control sobre la degradación de las proteínas.

3.2.1. Análisis del control transcripcional de p53 sobre WIP y TAZ.

Como hemos descrito en la Introducción, p53 y otros miembros de la familia de p53 como p63 y p73, ejercen sus funciones en gran medida a través de su actividad transcripcional. Además, se ha descrito que p53 mutante puede actuar a nivel transcripcional ya sea directa o indirectamente a través de otros elementos de la familia de p53, como p63, regulando así finalmente la expresión de distintos genes ([Muller and Vousden, 2013](#); [Strano et al., 2007](#)).

De tal forma, nos planteamos si p53 mutante ejercía un control transcripcional sobre WIP y TAZ en los GBs.

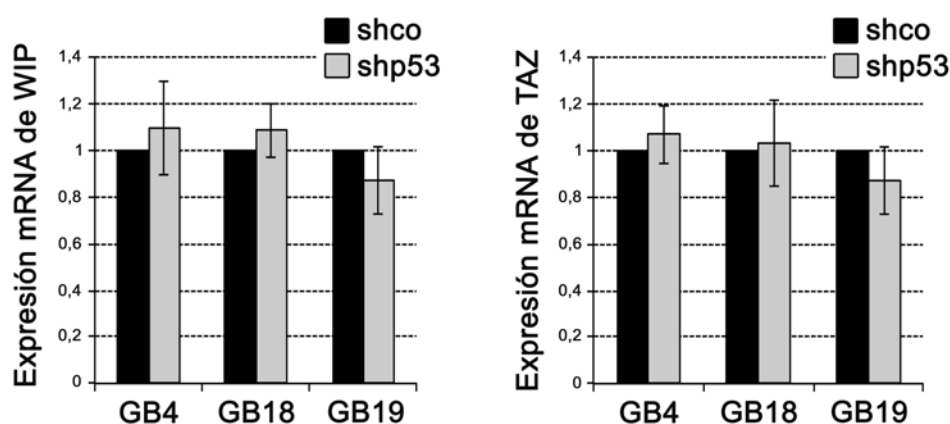


Figura R21. Expresión de mRNA de WIP y de TAZ en GBs:

Explantos de glioblastomas de pacientes GB4, GB18 y GB19 interferidos con shco y shp53. Análisis por RT-qPCR de WIP y de TAZ. Las barras de error representan la SD.

Para ello, se determinó la cantidad de mRNA de WIP y de TAZ, mediante un análisis de RT-qPCR en tiempo real, en los tres GBs que presentan p53 mutante de forma endógena (GB4, GB18 y GB19). Los datos indican que no existen diferencias significativas en la cantidad de mRNA de WIP ni de TAZ en los distintos GBs entre la situación control o tras la eliminación de p53 mutante (**Fig. R21**). De esta forma, podemos concluir que no parece que la regulación p53 mutante sobre WIP y TAZ sea a nivel transcripcional.

3.2.2. p53 mutante y WIP controlan la vida media de TAZ a través de degradación mediada por proteosoma.

TAZ es una proteína con presencia en varios compartimentos celulares y su vida media parece estar controlada por la unión de determinados ligandos y, en parte, por medio de fosforilaciones y posteriores ubiquitinaciones que la llevan a degradación mediada por proteosoma ([Liu et al., 2010](#)). Por ello, nos pareció obvio analizar si p53 mutante podría estar utilizando este mismo mecanismo para regular la vida media de TAZ y por otro lado, si WIP controla la vida media de TAZ de la misma forma.

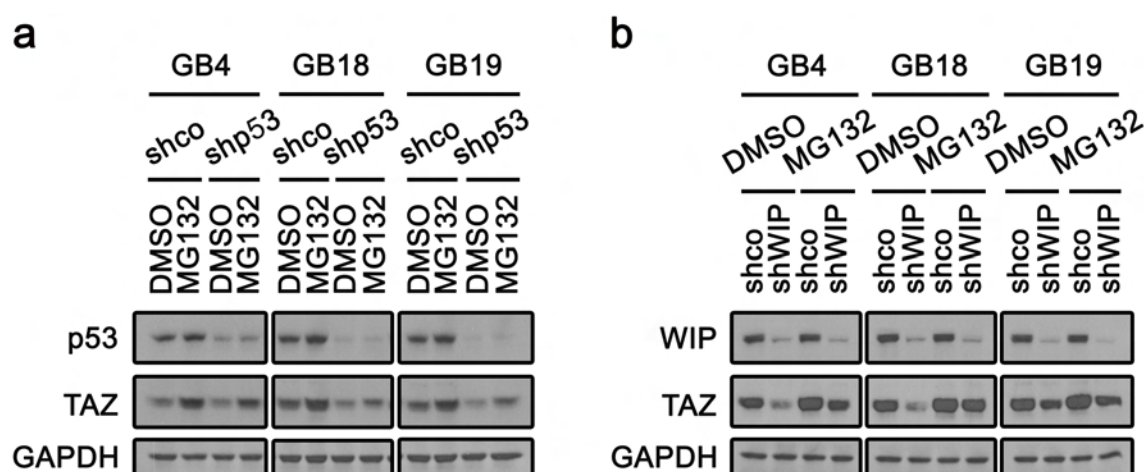


Figura R22. Degradación de TAZ por proteosoma:

Explantos de glioblastomas de pacientes GB4, GB18 y GB19 tratados con inhibidor de proteosoma MG132 10 μ M durante 3 horas. (a) Interferencia con shco y shp53. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, TAZ y GAPDH como control de carga. (b) Interferencia con shco y shWIP. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra WIP, TAZ y GAPDH como control de carga.

Cuando utilizamos el inhibidor de proteosoma MG132 pudimos ver como la eliminación de p53 produce una reducción de TAZ dependiente de proteosoma, ya que al utilizar el inhibidor de proteosoma MG132 se produce una acumulación en dicha proteína disminuyendo su degradación (**Fig. R22a**). Del mismo modo, WIP ejerce sobre TAZ una regulación similar a la que observamos que realiza p53 mutante (**Fig. R22b**). De este modo, podemos concluir que tanto la eliminación de p53 mutante como la eliminación de WIP ejercen una degradación de TAZ a través del proteosoma.

3.3. YAP/TAZ son esenciales para mantener la capacidad oncogénica de p53 mutante.

Hemos analizado como la eliminación de p53 mutante reduce los niveles de TAZ a través de WIP. En este punto, quisimos analizar si la sobre-expresión de p53 producía el efecto complementario sobre YAP/TAZ. Para ello, como hemos realizado anteriormente, utilizamos la estrategia de sobre-expresar mutantes de p53 en astrocitos primarios humanos. Para ello, transformamos los astrocitos usando la sobre-expresión de dos mutantes distintos de p53, el R175H y el R273H (Muller and Vousden, 2013).

En el análisis del *western-blot* de los extractos celulares de células en adhesión y cultivadas en medio DMEM 10% FBS con sobre-expresión de ambos mutantes de p53, R175H y R273H, se puede observar un evidente aumento en la cantidad de WIP y un incremento en la cantidad de YAP/TAZ (Fig. R23a), cuando lo comparamos con las células controles.

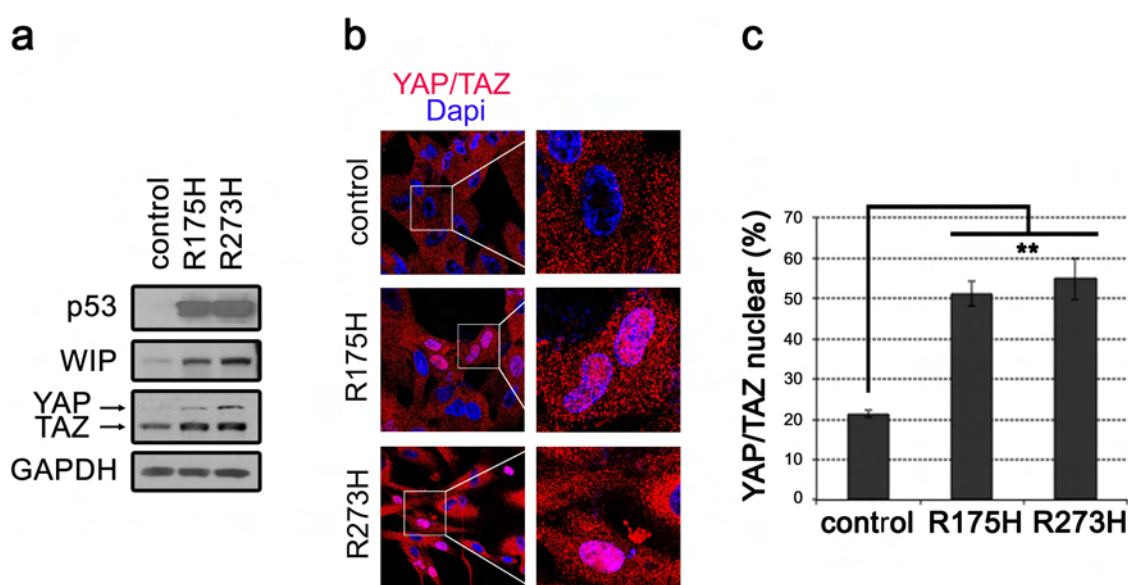


Figura R23. La sobre-expresión de p53 mutante regula YAP/TAZ:

Sobre-expresión de p53 mutante R175H y R273H en astrocitos primarios humanos. (a) Análisis de extractos totales de proteínas por *western-blot* con los anticuerpos específicos contra p53, WIP, YAP/TAZ y GAPDH como control de carga. (b) Inmunofluorescencia de la localización nuclear de YAP/TAZ. (c) Porcentaje de células con YAP/TAZ nuclear. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

Las proteínas YAP/TAZ pueden actuar como cofactor de transcripción, como mencionamos en la Introducción. Así, una forma de determinar su posible actividad transcripcional es comprobar el tránsito nuclear de YAP/TAZ y posteriormente, comprobar la capacidad para transcribir genes diana (Moroishi et al., 2015).

En la **figura R23b,c** se ve como p53 mutante da como respuesta no solo un aumento en la cantidad de YAP/TAZ si no también un incremento en el número de células con YAP/TAZ nuclear. Pasando de un 20% de células con YAP/TAZ nuclear

en los astrocitos controles a más del 50% de células con YAP/TAZ nuclear cuando se sobre-expresa ambos mutantes de p53 (**Fig. R23c**).

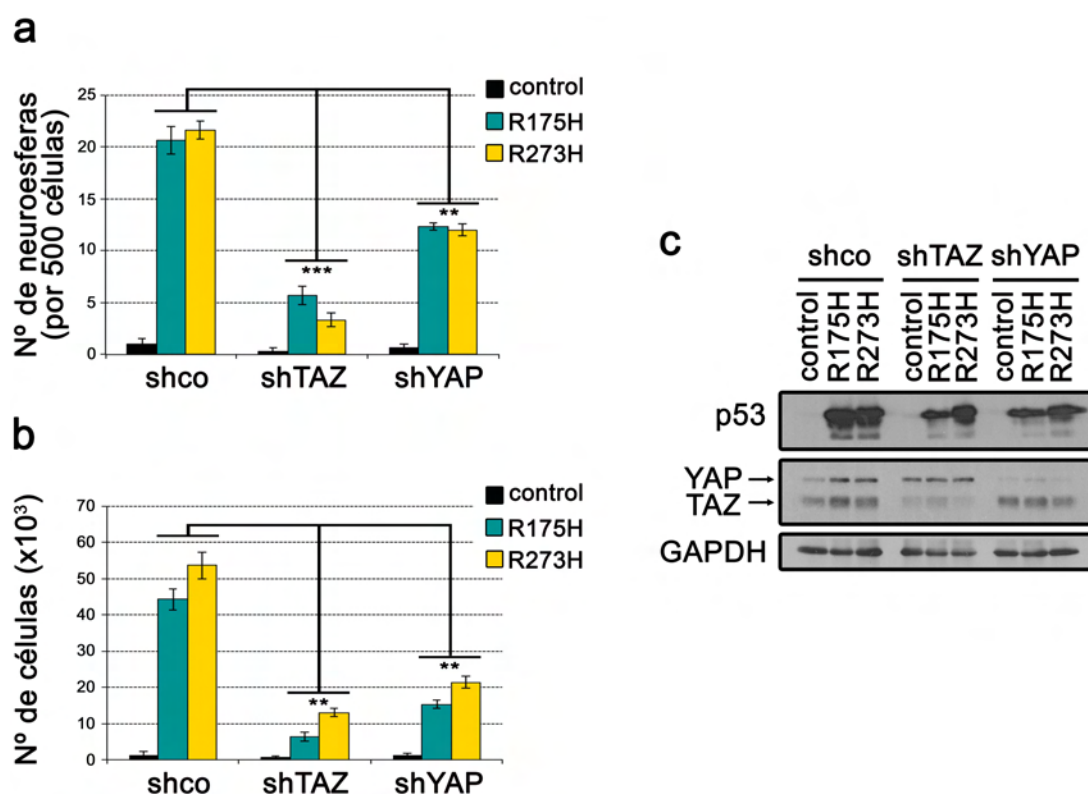


Figura R24. YAP/TAZ es necesario para la capacidad transformante de p53 mutante:

Astrocitos primarios humanos con sobre-expresión de p53 mutante R175H y R273H e interferencia con shco, shTAZ y shYAP. (a) Representación gráfica del número medio de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. (b) Representación gráfica del número medio de células. Las barras de error representan la SD. (c) Análisis de extractos totales de proteínas por *western-blot* con los anticuerpos específicos contra p53, YAP/TAZ y GAPDH como control de carga. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

Como indicamos anteriormente, los astrocitos primarios humanos transformados con p53 mutante tienen la capacidad transformante aumentada, incrementando la capacidad de crecer en suspensión en medio que favorece positivamente la proliferación de las células desdiferenciadas con fenotipo stem y la formación de esferas secundarias. Teniendo esto en cuenta, nos planteamos analizar que significa en estas células, así transformadas, reducir la expresión de YAP o TAZ. Así, la interferencia de YAP (shYAP) y en mayor medida la de TAZ (shTAZ) reducen drásticamente las esferas secundarias y el número de células totales, en comparación con el shRNA control (shco) (**Fig. R24a,b**).

Este resultado hace hincapié en el papel de estas dos proteínas (TAZ y YAP) en el mantenimiento y proliferación de las células con fenotipo CSC, concluyendo que YAP/TAZ son necesarias para la transformación oncogénica que genera p53 mutante. En la **figura R24c** podemos comprobar bioquímicamente los extractos celulares, observando como la sobre-expresión de los distintos mutantes de p53 aumentan la cantidad de YAP/TAZ en situación shco. Por otro lado, comprobamos el buen

funcionamiento y la especificidad de los interferentes shTAZ y shYAP que disminuyen de forma evidente TAZ y YAP respectivamente (**Fig. R24c**).

3.4. p53 mutante y WIP controlan el transito nuclear de YAP/TAZ.

Como hemos observado que la sobre-expresión de p53 mutante en los astrocitos primarios produce una variación en el transito nuclear de YAP/TAZ (**Fig. R23b,c**), nos planteamos si, en la línea celular de glioblastoma U-373 MG que presenta de forma endógena p53 mutante, tanto la eliminación de p53 como la eliminación de WIP podría modificar la cantidad y la presencia nuclear de YAP/TAZ.

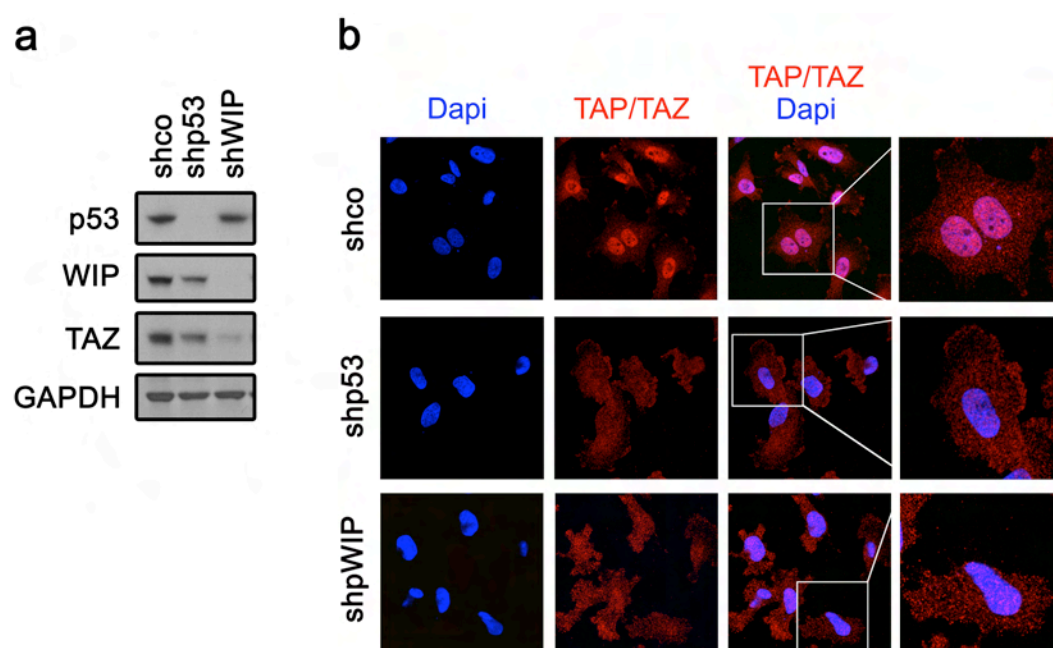


Figura R25. p53 mutante y WIP promueven la localización nuclear de YAP/TAZ:

Línea celular U-373 MG interferida con shco, shp53 o shWIP. (a) Análisis de extractos totales de proteínas por *western-blot* con los anticuerpos específicos contra p53, WIP, TAZ y GAPDH como control de carga. (b) Inmunofluorescencia de la localización nuclear de YAP/TAZ.

Pudimos comprobar que en la línea celular de glioblastoma U-373 MG, la cual expresa de forma endógena p53 mutante y WIP, la eliminación de p53 (shp53) o de WIP (shWIP) mediante shRNA lentivirales, produce una buena reducción de dichas proteínas (**Fig. R25a**). En este *western-blot* podemos observar que la eliminación de p53 provoca una reducción tanto en WIP como en TAZ comparada con el shRNA control (shco) y que la interferencia de WIP produce igualmente una reducción en la cantidad de TAZ (**Fig. R25a**).

A su vez observamos como la eliminación de p53 y de WIP no solo afectan a la cantidad total de la proteína TAZ, si no que esta disminución en la cantidad total de proteína correlaciona con una reducción en la cantidad de células que tienen YAP/TAZ de forma nuclear (**Fig. R25b**), tanto con la interferencia de p53 como con la interferencia de WIP. Mientras que en la situación control el 75% de las células tienen

un YAP/TAZ con localización nuclear, cuando se elimina p53 o WIP se reduce a un 30-25% la cantidad de células con YAP/TAZ nuclear (shp53-shWIP, respectivamente).

De esta manera, en este apartado podemos concluir que tanto la eliminación de p53 mutante como la eliminación de WIP baja la cantidad y el transito nuclear de YAP/TAZ.

4. Análisis de la regulación de YAP/TAZ a través de p53 mutante y la ruta del mevalonato.

Recientemente se ha identificado que p53 mutante regula genes involucrados en la ruta del mevalonato implicada en la síntesis del colesterol (Freed-Pastor et al., 2012). Por otra parte, también se ha demostrado que la actividad de YAP/TAZ es controlada por la ruta del mevalonato y que la eliminación de p53 produce una bajada en el transito nuclear de YAP/TAZ. Estos autores proponen que la regulación de p53 y YAP/TAZ podría estar sucediendo por medio de la regulación de la ruta del mevalonato (Sorrentino et al., 2014). En ambas publicaciones utilizan estatinas (por ejemplo Simvastatina) como inhibidores de la enzima HMGCR que convierte HMG-CoA a mevalonato (Freed-Pastor et al., 2012; Sorrentino et al., 2014).

Por estos datos publicados y dado los resultados obtenidos sobre el transito nuclear de YAP/TAZ, consideramos interesante comprobar si en nuestro sistemas celulares p53 mutante podría estar regulando YAP/TAZ a través de la ruta del mevalonato.

Así, comprobamos que el tratamiento con Simvastatina tanto a 1 μ M como a 10 μ M en el carcinoma de mama MDA-MB-231, regulaba el transito nuclear, obteniendo con la concentración de Simvastatina de 10 μ M una reducción del 67% en el número de células que presentan YAP/TAZ nuclear (Fig. R26).

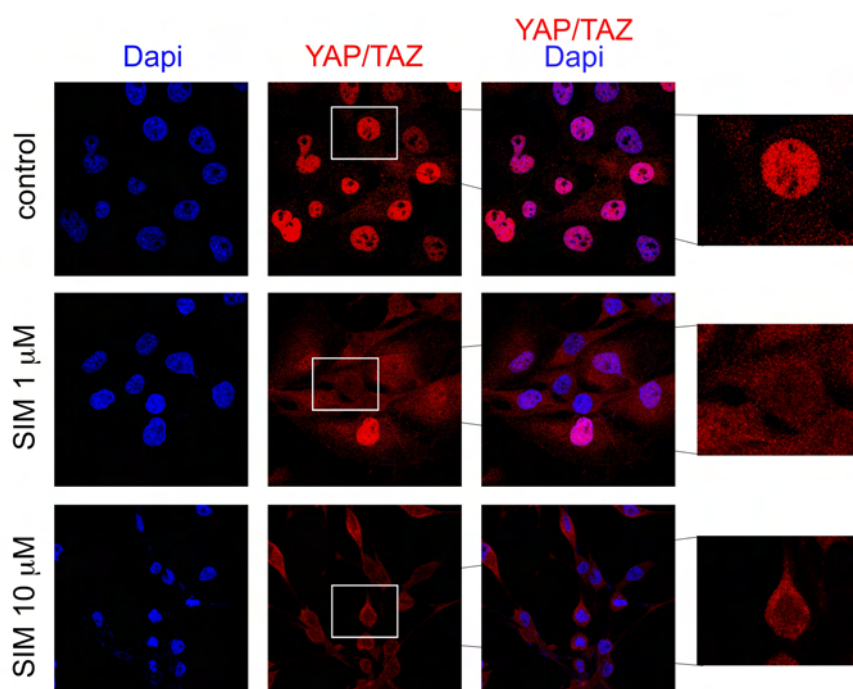


Figura R26. Control del transito nuclear de YAP/TAZ a través de Simvastatina:

Inmunofluorescencia de la localización nuclear de YAP/TAZ en la línea celular MDA-MB-231 tratada con Simvastatina (SIM) (1 μ M y 10 μ M) durante 24 horas.

El análisis bioquímico de los extractos de estas células tratadas con Simvastatina a 10 μ M revela que el carcinoma de mama MDA-MB-231 presenta una

disminución en la cantidad de YAP/TAZ del 50%, donde parece haber un incremento en la cantidad de YAP fosforilado (serina 127) con respecto a la cantidad de YAP, lo que indica una degradación dependiente de HIPPO (**Fig. R27a**), al igual que lo que está publicado ([Sorrentino et al., 2014](#)). Como podemos observar, el tratamiento con la Simvastatina produce una bajada de la cantidad de proteína nuclear correlacionable con una reducción en la actividad transcripcional de YAP/TAZ medida a través de una de sus proteínas diana, Survivina (**Fig. R27a**). Por el contrario, los tratamientos con Simvastatina no producen variaciones en la cantidad de WIP.

Por otro lado, cuando analizamos nuestro sistema de sobre-expresión de p53 mutante R273H en astrocitos primarios, crecidos en suspensión en condiciones de cultivo CSC, comprobamos como la sobre-expresión de R273H incrementa la cantidad de TAZ y que esta no es regulada por Simvastatina (**Fig. R27b**). A su vez, el mutante R273H de p53 también incrementa los niveles de YAP fosforilado en serina 127 comparado con el control sin sobre-expresión y el tratamiento con Simvastatina no parece modificar dicha fosforilación (**Fig. R27b**).

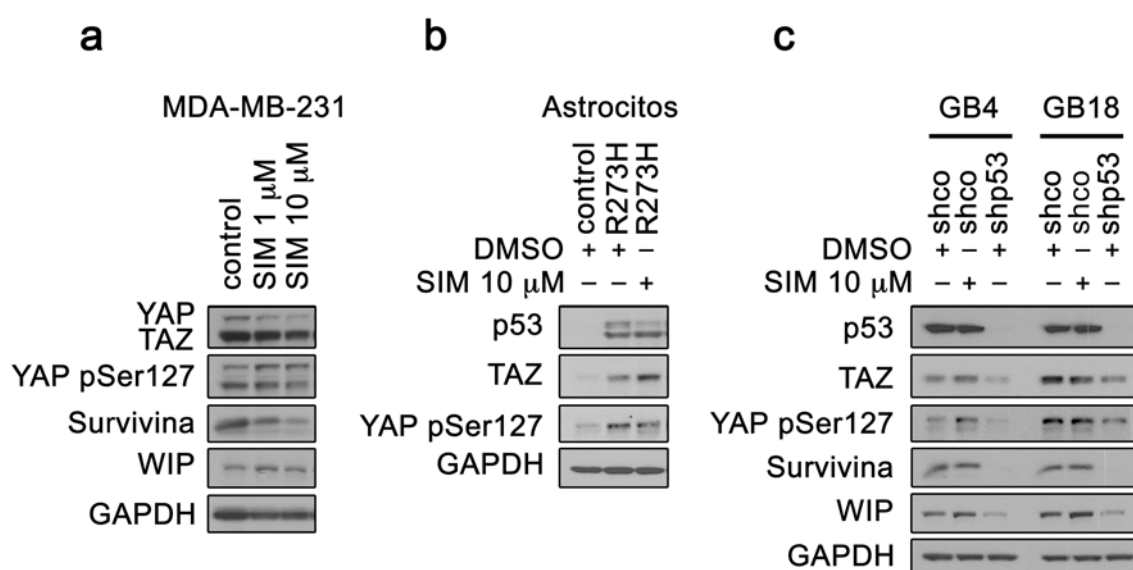


Figura R27. Control de la cantidad total de YAP/TAZ a través de Simvastatina:

(a) Línea celular MDA-MB-231 tratada con Simvastatina (SIM) (1 μ M y 10 μ M) 24 horas. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra YAP/TAZ, YAP pSer127, Survivina, WIP y GAPDH como control de carga. (b) Astrocytes con sobre-expresión de p53 mutante R273H tratada con Simvastatina (SIM) 10 μ M 24 horas. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, TAZ, YAP pSer127 y GAPDH como control de carga. (c) Explantes de pacientes con glioblastomas (GB4 y GB18) interferidos con shco y shp53 y tratados con Simvastatina (SIM) 10 μ M 24 horas. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, TAZ, YAP pSer127, Survivina, WIP y GAPDH como control de carga.

De forma análoga estudiamos la respuesta de los GBs al tratamiento con Simvastatina. Así, comprobamos de nuevo como la eliminación de p53 produce una bajada tanto en WIP como en TAZ (**Fig. R27c**). Por otro lado, el resultado muestra como la interferencia de p53 produce una bajada en la cantidad de YAP fosforilado en

serina 127. Como control interno podemos comprobar que la eliminación de p53 produce una falta de actividad transcripcional de TAZ comprobada mediante el descenso de una de sus dianas transcripcionales, Survivina (**Fig. R27c**).

De manera similar a lo descrito para astrocitos transformados con p53 mutante, el tratamiento con Simvastatina en los GBs (GB4 y GB18) no produce ningún efecto significativo sobre la cantidad de WIP, ni en el nivel de TAZ, ni en el nivel de YAP pSer 127, ni en Survivina (**Fig. R27c**).

Resumiendo todos los datos obtenidos en este apartado con respecto a los tratamientos con Simvastatina, podemos concluir que la regulación en YAP/TAZ que observamos en nuestro sistema no parece ser a través de un control en la ruta del mevalonato y que dicha ruta no parece controlar la cantidad de WIP, al menos en la condición de cultivos en CSC.

5. p53 mutante y WIP son necesarios para la capacidad invasiva de GBs.

Uno de los mayores problemas terapéuticos que aparece en los glioblastomas es su alta capacidad de invasión produciendo lesiones infiltrantes difícilmente eliminables por cirugía (Louis et al., 2007; Maher et al., 2001). Debido a que las células con fenotipo de CSC pueden ser las responsables de los procesos de invasión y metástasis y que hemos visto que p53 mutante compromete la viabilidad de estas células con características *stem* (Fig. R11b,c), nos planteamos buscar que implicación podría tener p53 mutante y WIP en la capacidad de invasión de los GBs.

Para ello, realizamos un ensayo de invasión 3D en una matriz de matrigel/colágeno en GBs con p53 mutante (GB4 y GB18), tanto en situación control como tras interferir p53 (shp53) o WIP (shWIP). En las imágenes podemos observar que la capacidad de invasión, referida como la distancia en μm recorrida por las células desde el grupo celular inicial, se ve disminuida con la interferencia de shp53 y shWIP (Fig. R28a,b). Los resultados muestran que la distancia de invasión disminuye de forma estadísticamente significativa tanto con la interferencia de p53 (descenso de la distancia de invasión del 42% en GB4 y del 52% en GB18) como tras la interferencia de WIP (reducción en la invasión del 60% en GB4 y del 39% en GB18) (Fig. R28c). De tal forma, podemos concluir que tanto p53 mutante como WIP son necesarios para la capacidad invasiva de los glioblastomas.

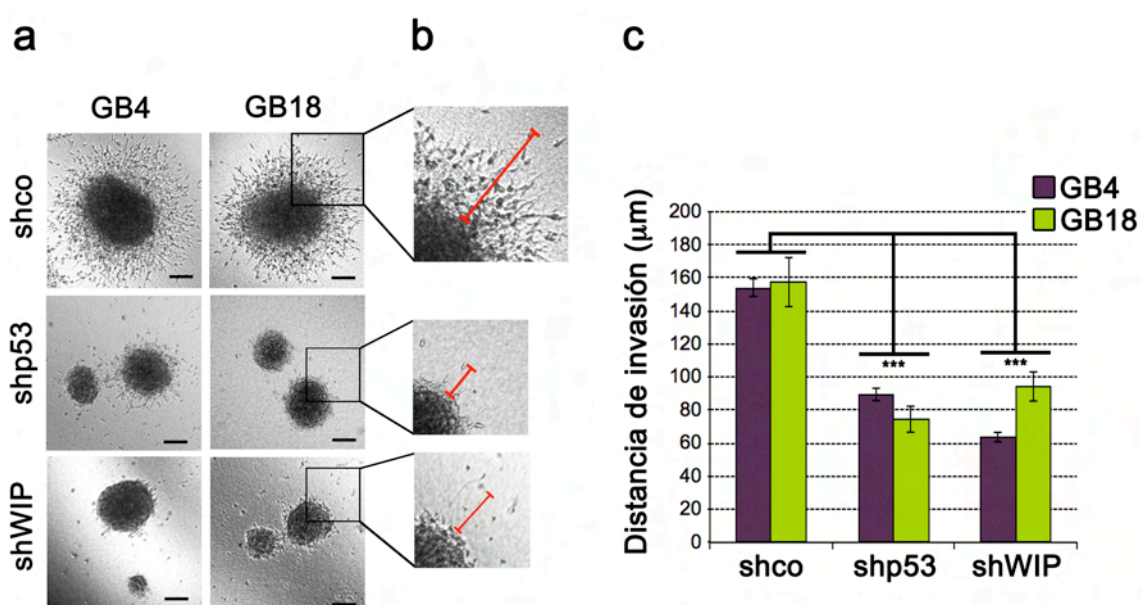


Figura R28. p53 mutante y WIP son necesarios para la capacidad invasiva de los glioblastomas:

Explantes procedentes de tumores de glioblastomas humanos (GB4 y GB18) interferidos con shco, shp53 y shWIP. (a) Fotografías de las neuroesferas en cultivos 3D con matriz de matrigel/colágeno (barra de escala de 100 μm). (b) Detalle ampliado de las células invasivas. (c) Representación gráfica de la distancia de invasión media (μm). Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

6. Cooperatividad entre p53 mutante con WIP y YAP/TAZ.

Es común que en los tumores aparezcan distintas mutaciones génicas que produzcan cooperatividad, favoreciendo y aumentando la tumorigénesis de cada uno de los oncogenes por separado ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)). Si bien nuestros datos apoyan que gran parte de la actividad de p53 mutante utiliza a WIP y a YAP/TAZ para generar su capacidad oncogénica, también quisimos analizar si p53 mutante cooperaba con WIP o con YAP favoreciendo un incremento en la tumorigénesis.

6.1. Cooperatividad entre p53 mutante y WIP.

En primer lugar, nos planteamos analizar si p53 mutante cooperaba con WIP en el incremento de la tumorigénesis. Para ello, se sobre-expresó en los astrocitos primarios humanos los mutantes de p53 R175H y R273H y se combinó con la sobre-expresión de WIP. Podemos observar que se produce un cambio en la morfología celular con la sobre-expresión de WIP, pasando a ser las células más alargadas. La presencia de p53 R175H y R273H mantiene este fenotipo, digamos, menos epitelial (**Fig. R29a**).

Dado que el ensayo de formación de colonias en agar blando, como ya hemos comentado, evalúa *in vitro* si las células transformadas tienen la capacidad de crecer y dividirse sin unirse a un sustrato ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)), consideramos interesante analizar dicha característica en nuestro sistema.

Como indicamos, las células se mantienen en crecimiento en 3D durante 7 días y después determinamos el número de colonias presentes en cada combinación génica. De ésta forma, observamos un incremento en el número de colonias formadas en agar blando cuando se sobre-expresa WIP y/o combinaciones de p53 R175H y R273H (**Fig. R29a**). En la cuantificación de las colonias en agar blando observamos una sinergia entre p53 mutante y WIP, donde los mutantes de p53 R175H y R273H aumentan un poco el número de colonias en agar blando pasando de una media de 22 colonias/placa a una media de 45-39 colonias/placa (R175H y R273H respectivamente) (**Fig. R29b**). Por otro lado, la sobre-expresión de WIP resulta claramente potente en la formación de esferas, obteniendo 325 colonias/placa de media (**Fig. R29b**) y la expresión combinada de R175H o R273H incrementa este nivel a 526-560 colonias/placa respectivamente. Así podemos observar que cuando sobre-expresamos p53 mutante y WIP se obtiene un efecto potenciado. Este efecto correlaciona con la capacidad de generar neuroesferas como se observa en la última línea de la **figura R29a**.

En el *western-blot* obtenido de los extractos celulares de muestras similares a estas colonias, se puede comprobar la eficiencia de la sobre-expresión tanto de los

mutantes de p53 (R175H y R273H) como de WIP-GFP (**Fig. R29c**). A su vez, podemos observar como las células con p53 mutante R273H parecen mantener un mayor nivel de WIP-GFP (**Fig. R29c**).

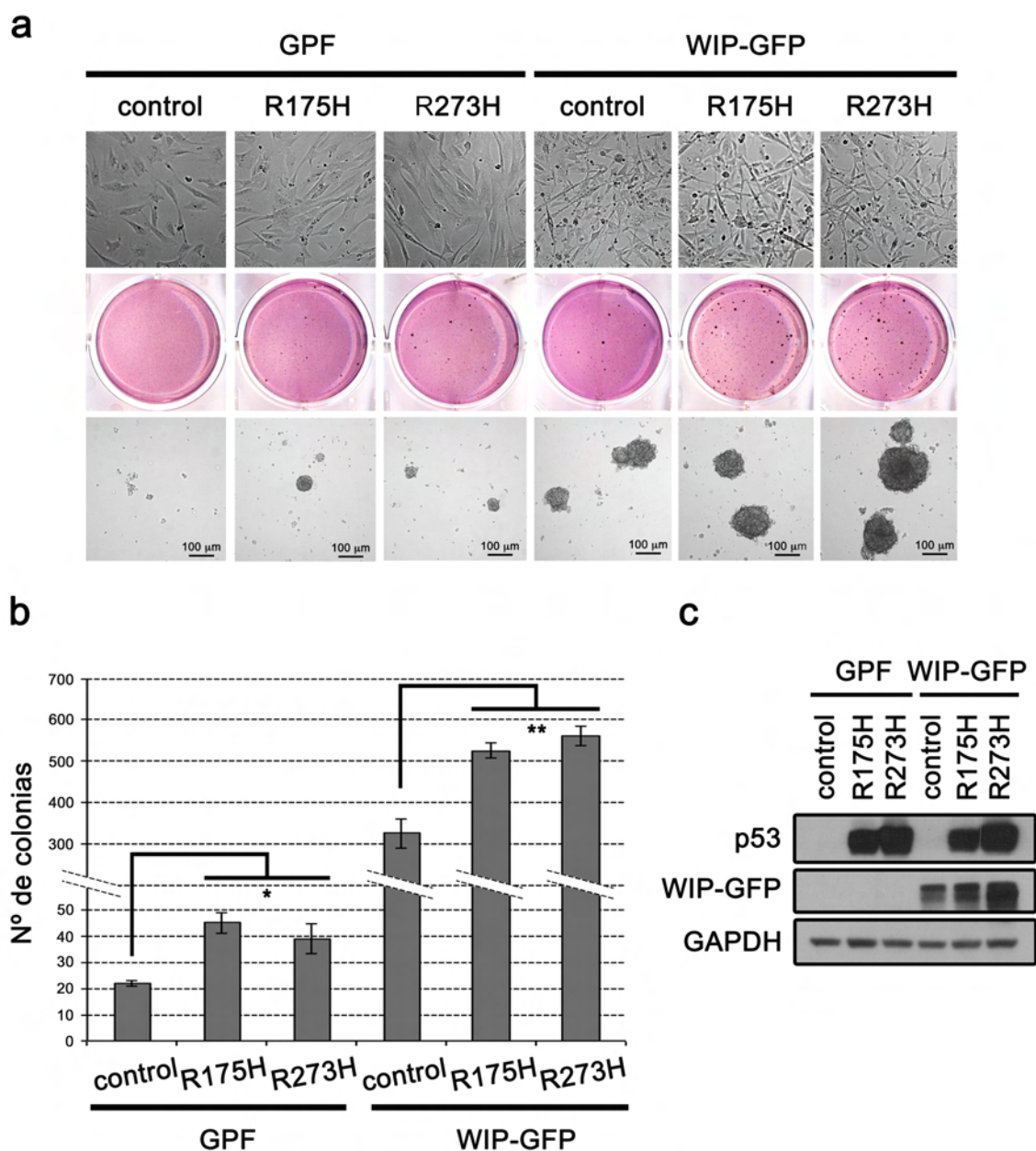


Figura R29. Cooperatividad entre p53 mutante y WIP:

Astrocitos con sobre-expresión de WIP-GFP y sobre-expresión de p53 mutante R175H y R273H. (a) Fotografías de las células en adhesión, crecimiento de colonias en agar blando y neuroesferas (barra de escala de 100 μ m). (b) Representación gráfica del número medio de colonias crecidas en agar blando. Las barras de error representan la SD. (c) Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con los anticuerpos específicos contra p53, WIP y GAPDH como control de carga. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

Podemos concluir que existe una cooperatividad entre p53 y WIP, siendo el efecto que produce la combinación de ambos más potente que la suma teórica de los dos por separado en el crecimiento 3D formando colonias.

Así postulamos que este efecto cooperativo dependería mayoritariamente de la expresión de YAP/TAZ. Para comprobarlo analizamos el potencial proliferativo,

mediante una curva de crecimiento celular en un ensayo de MTT, en los astrocitos primarios humanos transformados con WIP o con la combinación de WIP con los mutantes de p53. La interferencia de la expresión de YAP o TAZ mediante la infección de lentivirus con shRNA (shco, shTAZ o shYAP) redujo drásticamente la tasa de proliferación cuando en las células es sobre-expresado WIP o WIP más p53 mutante (Fig. R30).

Se puede concluir por tanto, que es esencial la presencia de YAP/TAZ para desarrollar la capacidad oncogénica y transformante que genera WIP y p53 mutante, solos y en combinación.

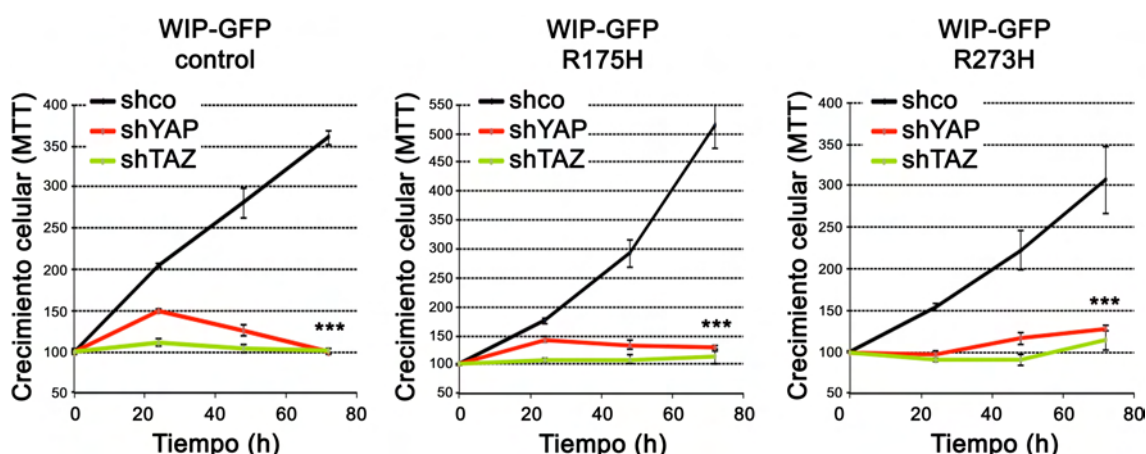


Figura R30. El efecto de WIP o WIP en cooperatividad con p53 es YAP/TAZ dependiente:

Curva de crecimiento celular por ensayo de MTT en astrocitos con sobre-expresión de WIP-GFP y mutantes de p53 R175H y R273H con interferencia de shco, shYAP y shTAZ. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

6.2. Cooperatividad entre p53 mutante y YAP.

En segundo lugar, nos planteamos analizar si p53 mutante cooperaba con YAP en el incremento de la tumorigénesis. Para ello, se sobre-expresó en los astrocitos primarios humanos los mutantes de p53 R175H y R273H y se combinó con la sobre-expresión de YAP WT o de YAP S5A.

Como ya hemos comentado en la Introducción, el mutante YAP 5SA tiene mutadas las 5 serinas resultando indegradable y presentando una elevada actividad basal y una alta capacidad tumorigénica (Zhao et al., 2007).

Comprobamos otra vez que la sobre-expresión de los distintos mutantes de p53 incrementan el crecimiento en neuroesferas (Fig. R31a,b) correlacionando con un aumento en la estabilidad de la proteína y en su capacidad transcripcional, medida por una de sus dianas transcripcionales, CTGF (Fig. R31c).

Cuando se sobre-expresa los mutantes de p53 junto con YAP WT, observamos un evidente incremento en la capacidad de generar neuroesferas en comparación con la sobre-expresión de ambas proteínas por separado, siendo similar al resultado

obtenido con YAP 5SA (**Fig. R31a,b**). A su vez, la sobre-expresión conjunta de YAP y p53 mutante incrementa la capacidad transcripcional de YAP medida a través de CTGF (**Fig. R31c**).

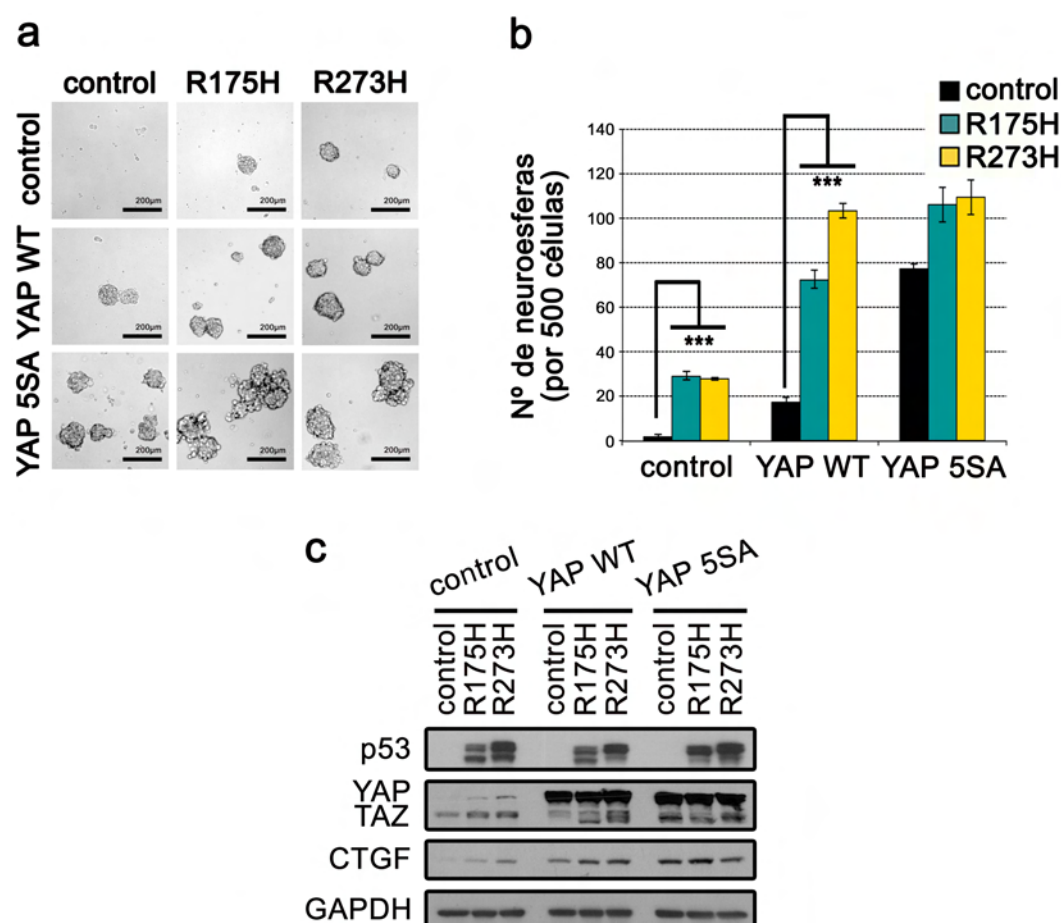


Figura R31. Cooperatividad entre p53 mutante y YAP:

Astrocitos con sobre-expresión de YAP WT y YAP 5SA y posterior sobre-expresión de p53 mutante R175H y R273H. **(a)** Fotografías de las neuroesferas (barra de escala de 200 μ m). **(b)** Representación gráfica del porcentaje medio de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. **(c)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, YAP/TAZ, CTGF y GAPDH como control de carga. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

De tal forma, podemos concluir que existe una cooperatividad entre p53 y YAP, generando un efecto aditivo, simulando al efecto que produce el mutante no degradable de YAP, YAP 5SA.

7. Mecanismo de regulación entre p53 mutante y WIP.

En este nuevo capítulo de los resultados, decidimos abordar el estudio sobre cómo p53 podría estar regulando a WIP

7.1. Regulación entre p63 y WIP.

En un primer lugar, abordamos la idea, ya propuesta en la bibliografía, de que parte de la transformación que genera p53 mutante puede ser producida a través de una regulación inhibitoria sobre la proteína p63 (Muller et al., 2009), como ya hemos detallado en la Introducción. Se ha descrito que la pérdida simultánea de p53 mutante y de p63 recapitula el fenotipo p53 mutante (Muller et al., 2009). Se ha descrito que p53 interacciona con p63 impidiendo que p63 actúe de forma normal como factor de transcripción, lo que provoca una serie de desregulaciones asociadas al fenotipo de p53 mutante. Entre estas desregulaciones, parece haber una actividad constitutiva de la señalización de EGFR/integrinas a través de la activación de rutas de reciclaje de receptores de membrana, permitiendo una alta eficiencia de las actividades asociadas a la membrana, como señalización, adhesión y migración que se reflejan posteriormente en alta capacidad de invasión y metástasis (Muller et al., 2009). De tal forma, nos planteamos si p53 mutante podría estar regulando WIP promoviendo la tumorigénesis a través de la desregulación de p63. Para ello, se utilizó la línea celular de glioblastoma U-373 MG a la que se le interfirió p53 (shp53) y 24 horas después se interfirió p63 (shp63).

A partir de los extractos de estas células comprobamos primero la eficiencia de las interferencias y vimos en los *western-blot*s cómo la interferencia con shp53 reduce la proteína p53 y como la interferencia con shp63 reduce de forma más modesta, pero significativa, la cantidad de p63 que presentan estas células (**Fig. R32a**).

Además, observamos como la eliminación de p53 reduce WIP y como la eliminación de p63 produce un sorprendente incremento en la cantidad de WIP (**Fig. R32a**).

Por otro lado, pudimos observar cómo aumenta la cantidad de caspasa 3 activa cuando se elimina p53 y cómo la eliminación de p63 reduce dicha actividad en células que tienen p53 interferido (**Fig. R32a**). La muerte generada por la falta de p53 se ve restaurada, en parte, cuando se elimina p63, como se puede evidenciar también en las imágenes de las fotografías de las células (**Fig. R32b**). A su vez, observamos como se produce una recuperación en el número de células que resulta estadísticamente significativa, pasando de un 43% de células en situación shp53 a un 79% de células

en situación shp63/shp53 (**Fig. R32c**). De esta manera, podemos concluir que parece existir una regulación de p53 mutante sobre WIP a través de p63.

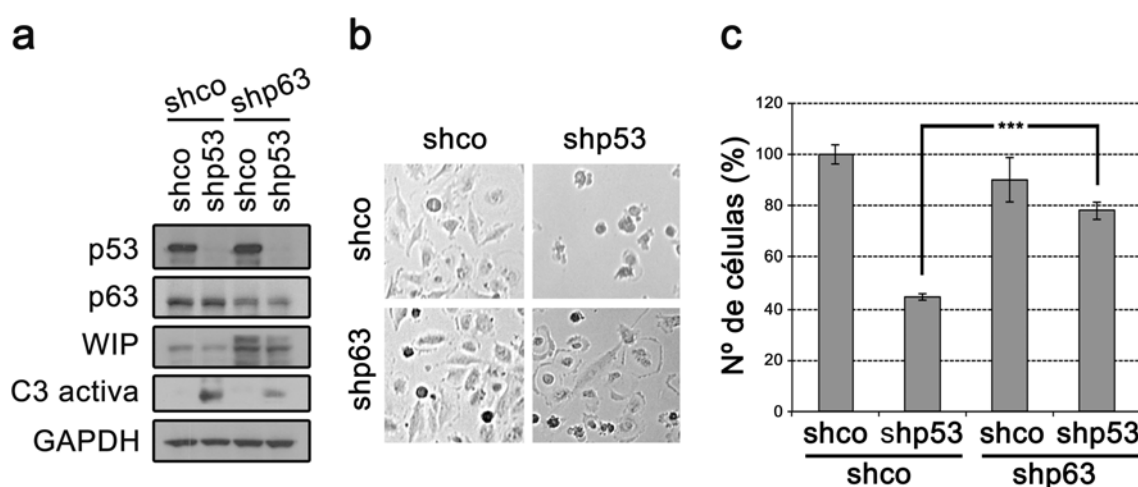


Figura R32. p63 regula WIP:

Línea celular U-373 MG interferida con shp53 y shp63. **(a)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, p63, WIP, caspasa 3 activa (C3 activa) y GAPDH como control de carga. **(b)** Fotografías en campo claro de las células adheridas. **(c)** Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

7.2. p53 mutante regula a WIP a través de receptores de membrana EGFR/integrinas.

Si parte del efecto que observamos de p53 mutante sobre la regulación de WIP es mediado por la disfunción de p63, nos planteamos comprobar anomalías en algún grupo de integrinas o receptores de membrana analizando la presencia de integrina $\alpha 6$, integrina $\beta 1$ y el receptor tirosina quinasa EGFR. Por un lado, pudimos determinar que la eliminación de p53 en los GBs produce una reducción estadísticamente significativa de la cantidad de integrina $\alpha 6$ que tienen estas células en la membrana (**Fig. R33**).

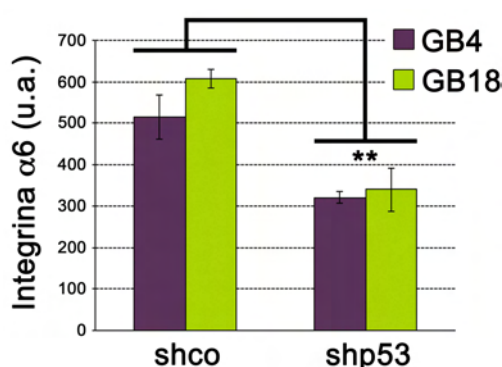


Figura R33. p53 mutante afecta a la cantidad de integrina $\alpha 6$ que hay en la membrana:

Representación gráfica de la media de intensidad de fluorescencia de integrina $\alpha 6$ en los explantes de pacientes con glioblastomas GB4 y GB18 con interferencia de shp53 medida por citometría de flujo. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

De forma complementaria a este resultado, decidimos analizar si el efecto de la sobre-expresión de distintos receptores que podían estar implicados en el reciclaje mediado por p53 y p63 como EGFR e integrinas (Muller et al., 2009) podían

compensar en cierta medida la eliminación de p53 mutante. Para ello, utilizamos la línea U-373 MG a la que se le sobre-expresó el receptor de membrana EGFR y la integrina $\beta 1$ por separado y en combinación. Posteriormente, se interfirió estas células con shp53 o shRNA control (shco) (**Fig. R34**).

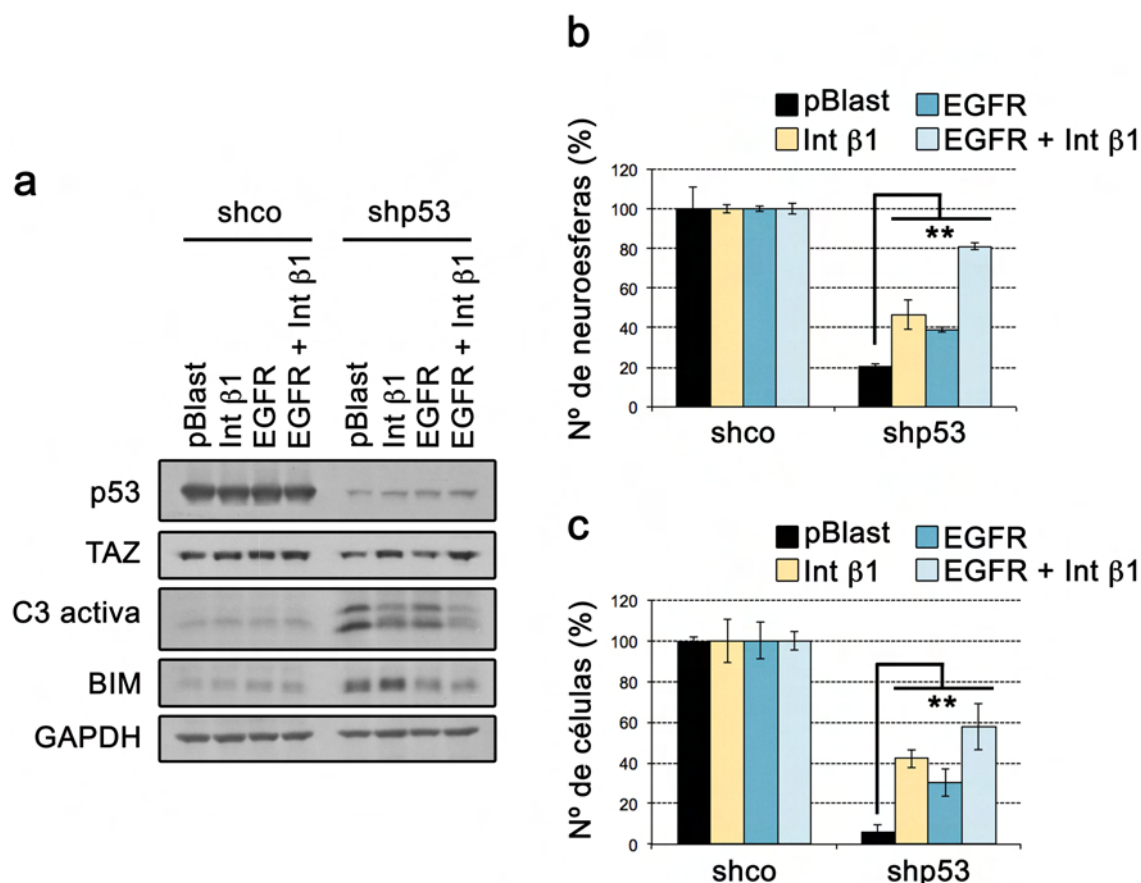


Figura R34. EGFR/integrina $\beta 1$ restablecen el fenotipo en células con eliminación de p53 mutante:

Línea celular U-373 MG con sobre-expresión de integrina $\beta 1$ (Int $\beta 1$), receptor EGF (EGFR) o EGFR + integrina $\beta 1$ (EGFR + Int $\beta 1$) y posterior interferencia con shp53 o shco. **(a)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, TAZ, caspasa 3 activa (C3 activa), BIM y GAPDH como control de carga. **(b)** Representación gráfica del porcentaje medio del número de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. **(c)** Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

En el análisis de los extractos celulares de las neuroesferas secundarias de este experimento pudimos comprobar como la interferencia de p53 con shp53 baja la expresión de la proteína p53 y como en situación de sobre-expresión control (plásmido utilizado denominado pBlast) la eliminación de p53 reduce la cantidad de TAZ en comparación con la situación control (shco) (**Fig. R34a**). Esta reducción de TAZ se recupera cuando sobre-expresamos integrina $\beta 1$ y más notablemente cuando sobre-expresamos de forma combinada EGFR con integrina $\beta 1$ (**Fig. R34a**).

Por otro lado, la activación en caspasa 3 producida por la eliminación de p53 se ve disminuida con la sobre-expresión de EGFR, Integrin $\beta 1$ o en mayor medida, con la combinación de ambos (**Fig. R34a**). A su vez, pudimos observar como la eliminación

de p53 genera un aumento en la cantidad de BIM y como este es claramente reducido cuando se sobre-expresa EGFR o la combinación de EGFR con integrina $\beta 1$ (**Fig. R34a**).

Estos resultados se ven acompañados por la recuperación que produce en el número de neuroesferas formadas la sobre-expresión de los receptores de membrana EGFR/integrina $\beta 1$ en las células que tienen p53 interferido. Se observa que la eliminación de p53 da una capacidad en estas células de formar esferas de una media del 20% en comparación con el control (shco), mientras que las células que tienen p53 interferido con sobre-expresión de EGFR o de integrina $\beta 1$ por separado se recupera la capacidad de formación de neuroesferas hasta una media del 39% en el caso de EGFR o del 47% en el caso de integrina $\beta 1$. Si se sobre-expresan ambos receptores (EGFR + integrina $\beta 1$) se recupera la capacidad de formación de neuroesferas en un 81% de media en aquellas células en las que se ha eliminado p53 (**Fig. R34b**), observándose resultados similares con respecto al número de células (**Fig. R34c**).

Dados estos resultados, decidimos analizar y estudiar el papel que ejerce integrina $\beta 1$ sobre WIP y TAZ cuando en unas células como el carcinoma de mama MDA-MB-231, se sobre-expresa integrina $\beta 1$ y se elimina p53 o WIP.

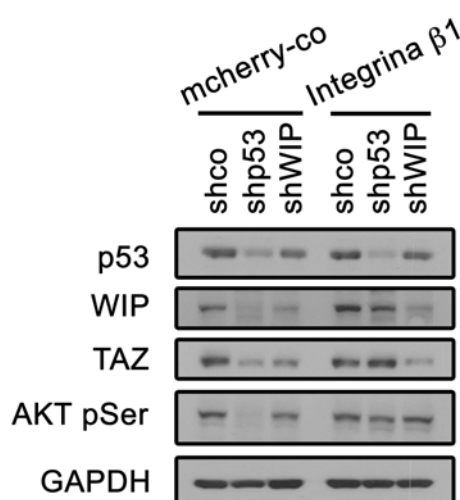


Figura R35. Integrina $\beta 1$ necesita a WIP para recupera la cantidad de TAZ cuando p53 mutante es eliminado:

Línea celular MDA-MB-231 con sobre-expresión de integrina $\beta 1$ o mcherry-co (plásmido control de sobre-expresión) y posterior interferencia con shco, shp53 o shWIP. Análisis de extractos totales de proteínas por *western-blot* con los anticuerpos específicos contra p53, WIP, TAZ, AKT pSer y GAPDH como control de carga

En la **figura R35** volvemos a comprobar como en situación control de sobre-expresión (plásmido control de sobre-expresión: mcherry-co) la eliminación de p53 reduce los niveles tanto de WIP como de TAZ y como la interferencia de WIP produce el mismo efecto sobre TAZ. Mientras que cuando sobre-expresamos integrina $\beta 1$ (comprobada a través de la expresión cherry) podemos observar cómo la presencia de integrina $\beta 1$ es suficiente para recuperar la cantidad de WIP y de TAZ en las células con p53 interferido, además de la cantidad de AKT pSer (**Fig. R35**). Por el contrario, cuando eliminamos WIP, no se produce la recuperación de TAZ tras la sobre-expresión de integrina $\beta 1$ (**Fig. R35**).

Con estas observaciones, podemos postular que la sobre-expresión de integrina $\beta 1$ permite recuperar la falta de actividad oncogénica de p53 mutante a nivel de WIP y de TAZ y además, permite proponer que para la recuperación de los niveles de TAZ es necesaria la presencia de WIP.

De tal forma, estos resultados evidencian la ruta de acción por la cual p53 mutante actúa sobre integrinas, WIP y TAZ.

7.3. Regulación entre AKT y WIP.

Considerando los resultados anteriormente obtenidos sobre cómo la pérdida de p53 mutante reduce drásticamente la actividad de AKT, quisimos comprobar si existía una relación jerárquica entre p53 mutante y la actividad de AKT y WIP. En primer lugar, realizamos un ensayo de funcionalidad de quinasas usando inhibidores de distintas quinasas, buscando si algunas de las quinasas más conocidas pudiesen regular tanto el efecto en el crecimiento en neuroesferas como la cantidad de WIP. Para ello, se trataron los astrocitos primarios humanos transformados con p53 mutante R273H con inhibidores de distintas quinasas durante 72 horas. Se utilizaron los inhibidores GDC-0941 (GDC) (inhibidor de PI3K de clase I), U0126 (inhibidor de MEK 1/2), Dasatinib (inhibidor de SRC), Y27632 (inhibidor de la proteína quinasa asociada a Rho) y como control del citoesqueleto se usó Citocalasina (inhibidor de la polimerización de actina).

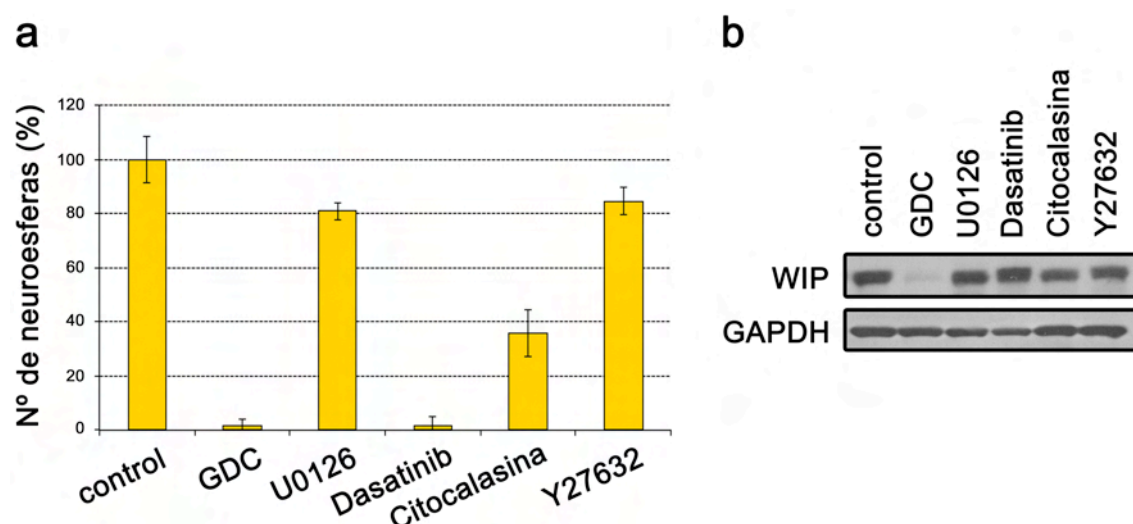


Figura R36. El inhibidor de PI3K de clase I, GDC reduce el número de neuroesferas y la cantidad de WIP:

Astrocitos con sobre-expresión de p53 mutante R273H tratadas durante 72 horas con inhibidores de distintas quinasas: GDC-0941 (GDC) 1 μ M, U0126 10 μ M, Dasatinib 200 nM, Citocalasina 1 μ M, Y27632 10 μ M. **(a)** Representación gráfica del porcentaje medio del número de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. **(b)** Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra WIP y GAPDH como control de carga.

Las concentraciones usadas se han determinado previamente en el laboratorio como suficientes para inhibir la actividad específica y sus concentraciones concretas se indican en la **figura R36**.

Pudimos ver que, aunque el tratamiento con Dasatinib redujo de forma drástica la capacidad de formación de neuroesferas (**Fig. R36a**) y la Citocalasina disminuyó más de un 60% la formación de neuroesferas (**Fig. R36a**), solo el tratamiento con GDC redujo de forma drástica tanto el número de neuroesferas como la cantidad de WIP mirada por *western-blot* (**Fig. R36a,b**). Como ya hemos dicho en la Introducción y es bien conocido, la actividad de PI3K de clase I se refleja directamente sobre la fosforilación de AKT, lo que conlleva un aumento en su actividad. De esta manera, consideramos relevante analizar en tejidos de pacientes sanos y en tejidos de pacientes con tumores gliales si existía una correlación entre la actividad de AKT, medida como AKT pSer, y la cantidad de WIP que presentaban estos tejidos (**Fig. R37**).

Tanto los datos del *western-blot* (**Fig. R37a**) como la cuantificación de la cantidad de proteínas (**Fig. R37b**) muestran como existe una correlación con un p-valor de $p = 0,004$ entre la cantidad de AKT pSer y la cantidad de WIP que se expresa en tejido. De este modo, observamos como los tejidos sanos tienen menor cantidad de AKT pSer y menor cantidad de WIP y por el contrario, los tejidos tumorales presentan mayores cantidades tanto de WIP como de AKT pSer.

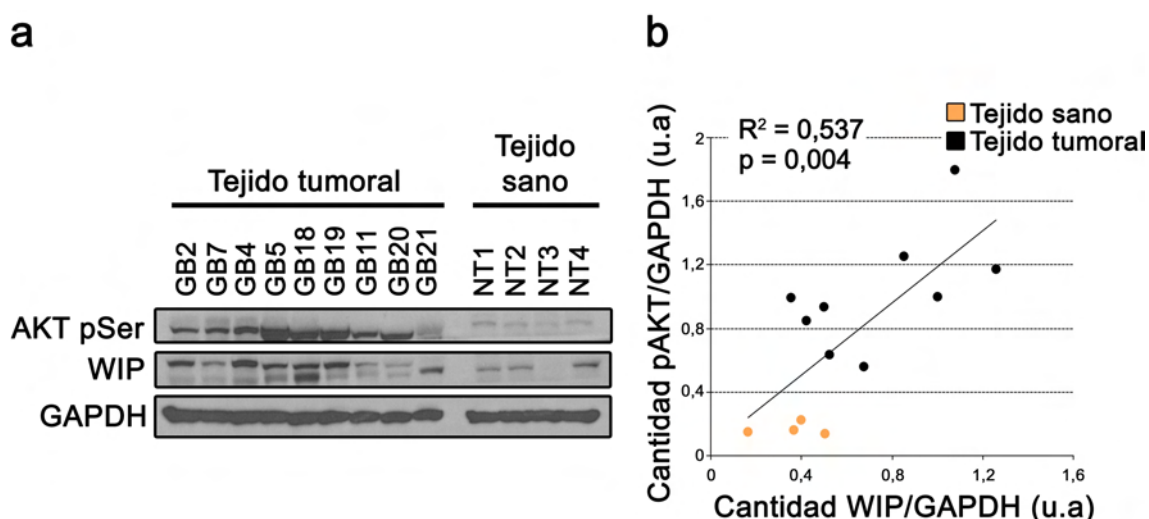


Figura R37. Correlación entre WIP y la actividad de AKT en tejido de pacientes:

Tejido tumoral de pacientes con glioblastomas (GBs) y tejidos de pacientes sanos (NT) (a) Análisis de los extractos de proteínas totales por *western-blot* con anticuerpos específicos contra AKT pSer, WIP y GAPDH como control de carga. (b) Representación gráfica de la correlación entre la cantidad de AKT pSer y WIP en unidades arbitrarias (u.a). Donde R^2 es el coeficiente de determinación y p es el p-valor (distribución t-Student).

Por otro lado, analizamos el efecto del inhibidor GDC en los explantes de glioblastomas procedentes de tumores humanos que presentan de forma endógena p53 mutante (GB4, GB18 y GB19).

En la imagen de las neuroesferas podemos observar como los tratamientos con GDC disminuyen la formación de neuroesferas (**Fig. R38a**). Cuando analizamos bioquímicamente los extractos de estas células podemos comprobar cómo los tratamientos con GDC reducen la actividad de AKT, medida como AKT pSer. A su vez, también se produce una clara reducción de WIP y de la proteína marcadora de CSC Nestina en comparación con las células en el tratamiento control (**Fig. R38b**).

Estos resultados se ven apoyados con la bajada estadísticamente significativa del número de neuroesferas (reducción en un 90%) (**Fig. R38c**) y del número de células (reducción de un 80%) (**Fig. R38d**).

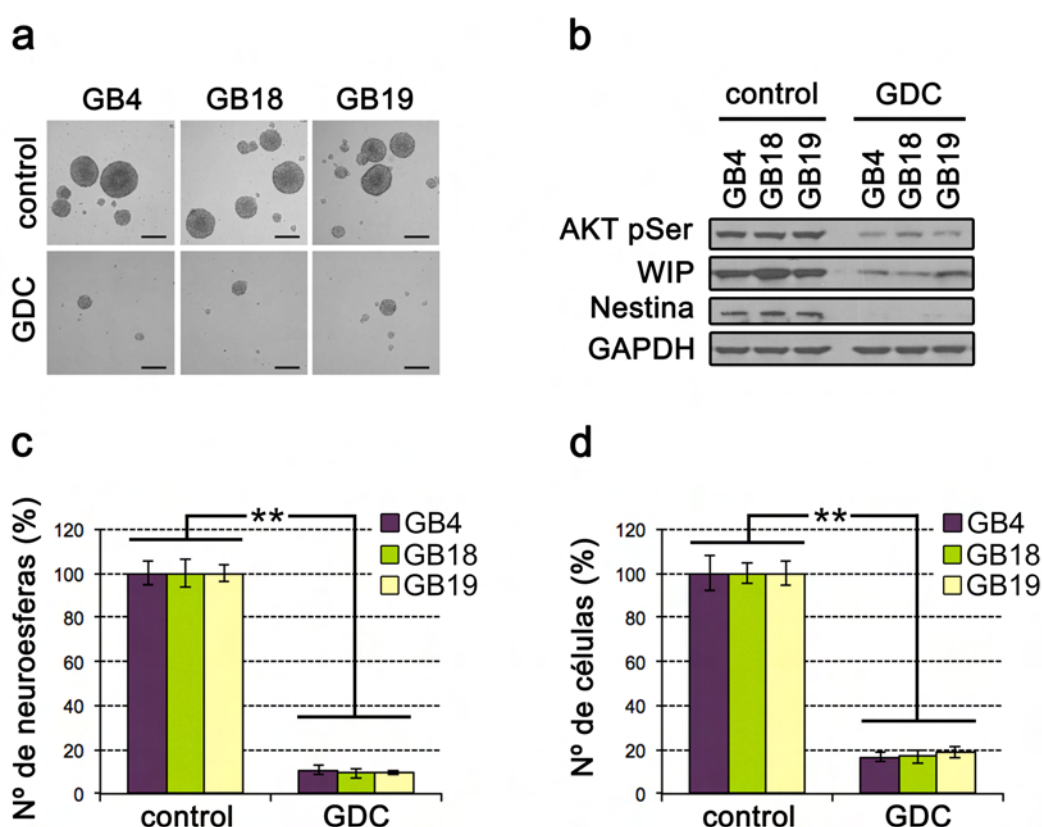


Figura R38. El inhibidor de PI3K de clase I, GDC, reduce la cantidad de WIP y el crecimiento de las neuroesferas:

Glioblastomas GB4, GB18 y GB19 tratados con GDC 1 μ M durante 72 horas. (a) Fotografías de las neuroesferas control y tratadas con GDC-0941 (GDC) 1 μ M (barra de escala de 200 μ m). (b) Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra AKT pSer, WIP, Nestina y GAPDH como control de carga (c) Representación gráfica del porcentaje medio de neuroesferas control y tratadas con GDC 1 μ M. Las barras de error representan la SD. (d) Representación gráfica del porcentaje medio del número de células control y tratadas con GDC 1 μ M. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

Este resultado nos hace concluir que en las células procedentes de glioblastomas que hemos analizado que tienen p53 mutante, WIP esta siendo regulado a través de la actividad de PI3K de clase I.

Tenemos dos formas diferentes de inhibir la actividad de AKT, una de ellas, la que ya hemos utilizado, por medio de inhibidores farmacológicos como GDC. La segunda, de una forma más selectiva a través del uso de interferentes para las distintas isoformas descritas, AKT1, AKT2, AKT3.

En un primer lugar, ya habíamos observado por *western-blot* que la línea celular de glioblastoma U-373 MG tiene niveles detectables de AKT1 y AKT2, pero no detectables de AKT3 en comparación con los astrocitos primarios (**Fig. R39a**), por lo que decidimos descartar la isoforma AKT3.

Recientemente se ha publicado que la isoforma AKT2 puede estar regulando el reciclaje de receptores de membrana que media RCP ([Jacquemet et al., 2013](#)). Dada la implicación de p53 mutante en este mecanismo decidimos analizar la función de AKT2. Pudimos observar como la eliminación de AKT2 (shAKT2) en la línea U-373 MG disminuye en un 95% el número de células en comparación con la situación de interferencia control (shco) (**Fig. R39b**). También se observa cómo en los astrocitos primarios el efecto de la eliminación de AKT2 no parece producir cambios con respecto al número de células (**Fig. R39b**).

Por ultimo, el *western-blot* de los extractos celulares de la línea U-373 MG muestra la eficiencia y la especificidad del shRNA de la isoforma de AKT2 utilizado, donde la eliminación de AKT2 disminuye la actividad de AKT, medida como AKT pSer (**Fig. R39c**).

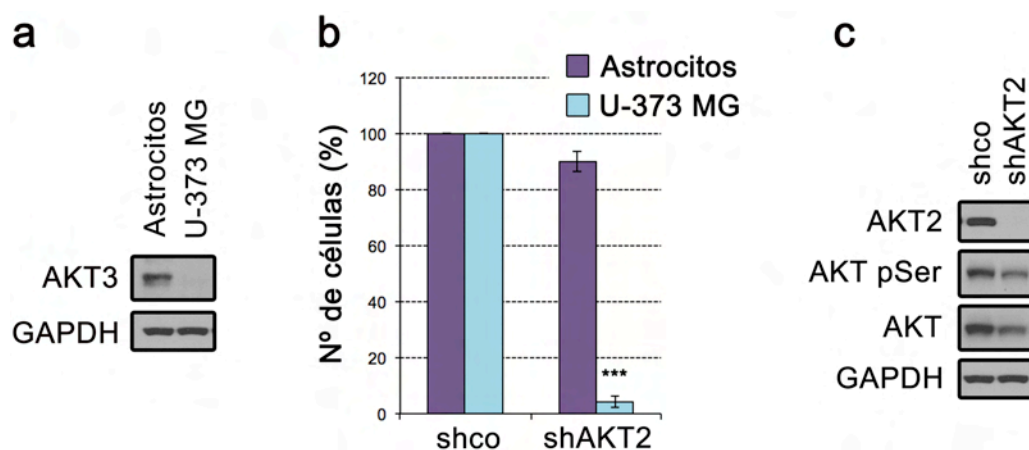


Figura R39. Análisis de las isoformas de AKT en U-373 MG:

(a) Análisis de los extractos totales de proteínas de astrocitos primarios humanos y de la línea celular U-373 MG por *western-blot* con anticuerpos específicos contra AKT3 y GAPDH como control de carga. (b) Representación gráfica del porcentaje medio de número de células en los astrocitos primarios y en la línea celular U-373 MG interferidos con shco y shAKT2. Las barras de error representan la SD. (c) Línea celular U-373 MG interferida con shco y shAKT2. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra AKT2, AKT pSer, AKT y GAPDH como control de carga. *** $p \leq 0,001$ (prueba t-Student).

A continuación, decidimos interferir en los GBs que presentan p53 mutante la isoforma AKT2 para discernir si podía estar regulando de forma específica la cantidad

de WIP. A su vez, utilizamos la interferencia de AKT1 como control de especificidad del proceso regulado por AKT2.

De tal forma, en la **figura R40** se interfirió en los distintos GBs que presentan p53 mutante las isoformas AKT1 y AKT2. Podemos observar en el análisis bioquímico como la eliminación de AKT2 y no la de AKT1 disminuye de forma evidente la cantidad de WIP y del marcador de *stem* Nestina (**Fig. R40a**). Además, en la imagen de las neuroesferas, la interferencia de AKT2 (shAKT2) resulta más potente a la hora de inhibir la formación de las neuroesferas en los glioblastomas que la interferencia de AKT1 (shAKT1) (**Fig. R40b**).

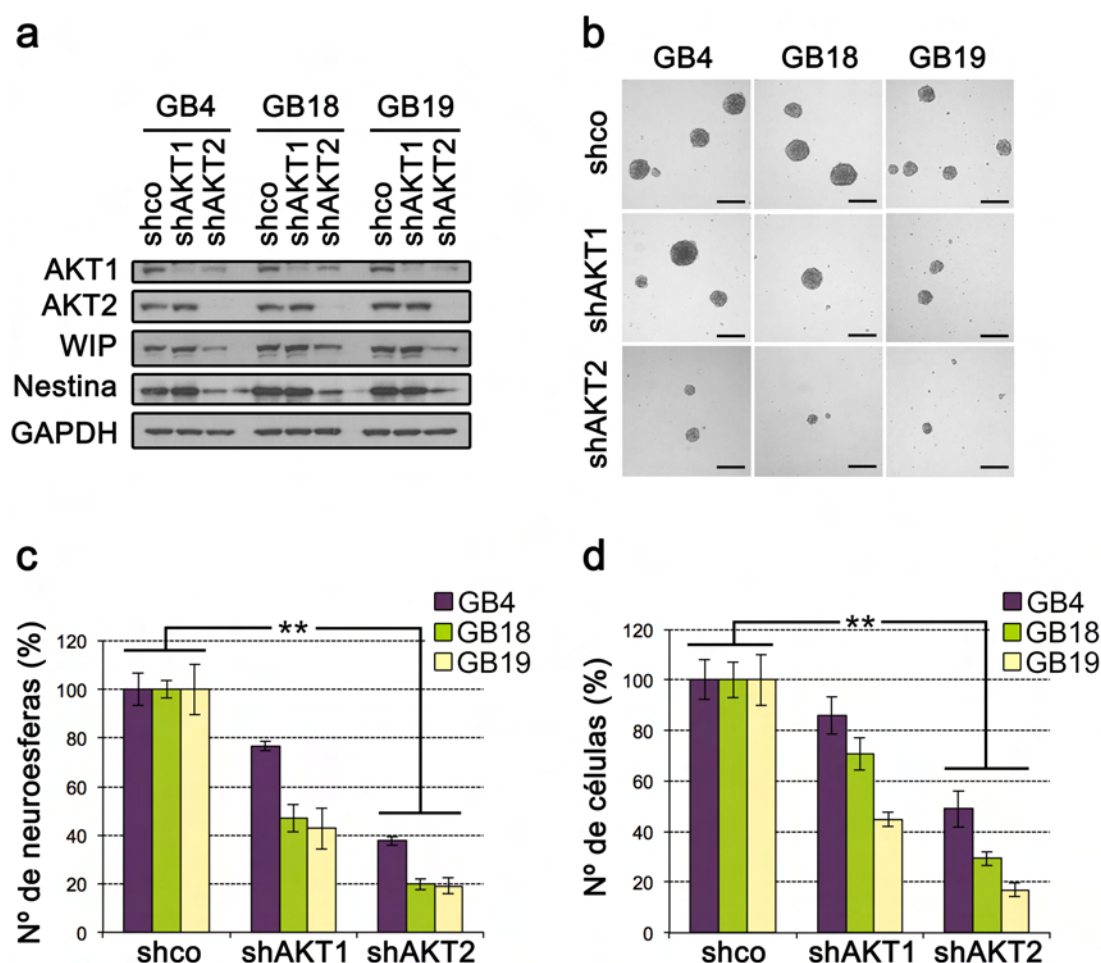


Figura R40. AKT2 regula WIP:

Explantos de pacientes con glioblastomas GB4, GB18, GB19 interferidos con shco y shAKT1 y shAKT2. (a) Análisis de extractos de proteínas totales por *western-blot* con anticuerpos específicos contra AKT1, AKT2, WIP, Nestina y GAPDH como control de carga. (b) Fotografías de las neuroesferas (barra de escala de 200 μm). (c) Representación gráfica del porcentaje medio de neuroesferas. Las barras de error representan la SD. (d) Representación gráfica del porcentaje medio del número de células. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

Este resultado se ve avalado tanto con el número de esferas como con el número de células, donde la eliminación de AKT2 disminuye la formación de esferas y el número de células de forma más potente que la eliminación de AKT1 (**Fig. R40c,d**).

Además, nuestros resultados muestran como en los glioblastomas GB4, GB18 y GB19 la eliminación de AKT2 (shAKT2) disminuye de forma más potente que la eliminación de AKT1 (shAKT1) la cantidad de células con fenotipo de CSC medido a través del marcados de *stem* CD133 (Fig. R41a). De forma paralela, se puede ver como la eliminación de AKT2 aumenta de forma significativa el porcentaje de células apoptóticas en los GBs medido mediante el marcaje de células Annexin V⁺/7AAD⁻ (Fig. R41b).

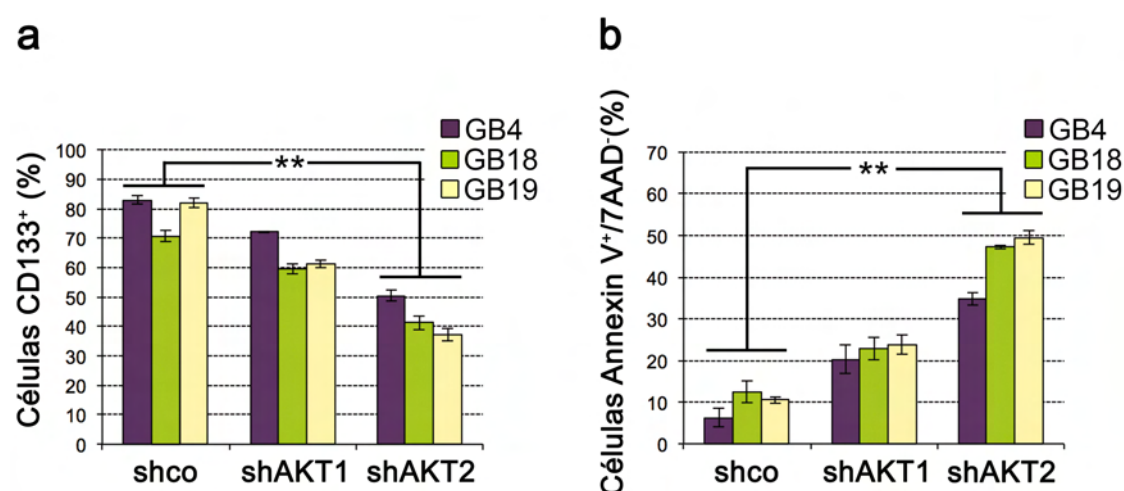


Figura R41. La eliminación de AKT2 disminuye las CSC y aumenta la muerte en las CSC de GBs:

Explantos de pacientes con glioblastomas GB4, GB18, GB19 interferidos con shco y shAKT1 y shAKT2. (a) Representación gráfica del porcentaje de células CD133⁺. Las barras de error representan la SD. (b) Representación gráfica del porcentaje de células Annexin V⁺/7AAD⁻. Las barras de error representan la SD. ** $p \leq 0,01$ (prueba t-Student).

Podemos concluir que la isoforma AKT2 controla la cantidad de WIP y su eliminación produce efectos similares a la eliminación de WIP en los GBs, viéndose AKT2 implicado en la proliferación, supervivencia, mantenimiento y capacidad *stem* de los GBs.

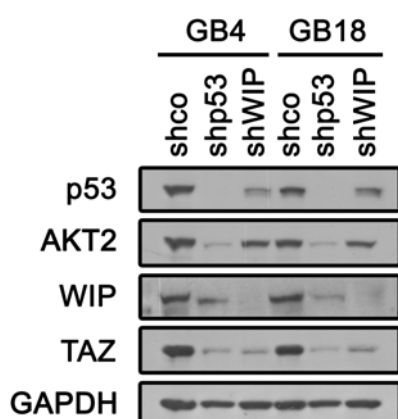


Figura R42. p53 mutante regula la isoforma AKT2, WIP y TAZ en los GBs:

GB4 y GB18 con interferencia de shco, shp53 o shWIP. Análisis de los extractos totales de proteínas por *western-blot* con anticuerpos específicos contra p53, AKT2, WIP, TAZ y GAPDH como control de carga.

Por último, para comprobar si en los glioblastomas humanos existe una regulación entre la presencia de p53 mutante sobre AKT2, se analizó el efecto de la interferencia de p53 sobre las isoforma de AKT2 usando como control la interferencia

de WIP. Así, cuando observamos los *western-blot*s de los GBs, vemos que la eliminación de p53 en los glioblastomas GB4 y GB18 disminuye de forma evidente la cantidad de AKT2 (**Fig. R42**). Por el contrario, la interferencia de WIP no parece variar de forma tan evidente la cantidad de la isoforma AKT2 (**Fig. R42**). A su vez, podemos comprobar como esta bajada en AKT2 correlaciona con un descenso en la proteína TAZ (**Fig. R42**).

Estos resultados nos hace concluir que la vía de acción de p53 mutante regula la isoforma AKT2 y que la función de AKT2 es necesario para la estabilización de WIP que conlleva una estabilización de TAZ.

Discusión

El propósito general de este trabajo ha sido analizar la ganancia de función oncogénica de p53 mutante y como genera una mayor supervivencia, favoreciendo el mantenimiento y la proliferación de células con fenotipo *stem* tumoral.

De los datos bibliográficos se podía proponer que las mutaciones somáticas en p53 favorecen varios procesos moleculares, por un lado habría una pérdida de la función normal de p53 como supresor de tumoral (ausencia de transcripción de p21, BAX, NOXA y PUMA) y por otro lado habría un incremento de la función oncogénica que se traduciría en el aumento de la supervivencia y proliferación (amplificando la actividad de MAPKs y PI3K/AKT) y un aumento de la capacidad de migración (favoreciendo la señalización de integrinas...), cuya combinación potenciaría la carcinogénesis.

Los aspectos más destacados de este trabajo son la descripción de nuevos elementos de señalización controlados por p53 mutante que son parte del mecanismo molecular que agrupa la iniciación/mantenimiento del fenotipo *stem*/mesenquimal en varios tipos tumorales. Esto permite proponer un novedoso mecanismo general de tumorigénesis mediado por p53 mutante, con importantes implicaciones en terapia humana.

1. p53 mutante y el aumento en la supervivencia.

Como ya hemos comentado anteriormente, de los datos de la bibliografía se podría proponer que una característica fundamental que tienen que desarrollar o incrementar las células tumorales es el aumento en distintas señales de supervivencia. De tal forma se puede bloquear distintos sistemas de muerte, permitiendo adquirir fenotipos con mayor autonomía de señales de crecimiento ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

En concreto se ha propuesto que a las células que presentan p53 mutante les falta la función supresora tumoral de p53 *wild type*. De esta manera, se genera en estas células una falta en los sistemas de control frente a daños en el DNA lo que puede favorecer la inestabilidad génica, quizás debido a la falta transcripcional de múltiples genes y a la acción combinada de estos (GADD45, p21...). Además, estas células parecen adquirir resistencia a una amplia variedad de tipos de estrés celular por la falta de inducción de la apoptosis mediada por BAX/PUMA/NOXA ([Kruse and Gu, 2009](#)). El aumento en la inestabilidad génica debido a la ausencia de p53 *wild type* puede generar en las células una mayor tendencia al desarrollo tumoral, por ejemplo, por acumulación de mutaciones, amplificaciones o deleciones en otros genes (como EGFR, PTEN, Myc...). De tal modo, el modelo de ratón p53^{-/-} presenta una

predisposición a desarrollar tumores espontáneos, siendo necesarias otras desregulaciones para el desarrollo completo de neoplasias malignas (Donehower et al., 1992).

En una primera interpretación se podía llegar a pensar que la falta de p53 *wild type* podía ser similar a la falta de p21, con respecto a la incidencia tumoral, pero a día de hoy se sugiere que ambos fenotipos no resultan tan similares, debido a que no todas las funciones de p53 *wild type* recaen sobre p21 (Choudhury et al., 2007). Del mismo modo, se puede plantear que la presencia de p53 mutante resulta equivalente a la falta de p53 *wild type*, pero ambos fenotipos no son tan semejantes. Los modelos de ratón que presentan un alelo mutado de p53 tienen la disfunción por la falta de p53 *wild type*. Pero, estos ratones generan un fenotipo distinto a los ratones p53^{-/-} ya que desarrollan un amplio espectro de tumores agresivos con capacidad invasiva o con metástasis distal (carcinoma de mama, glioblastoma, adenocarcinomas de pulmón con características malignas...). Estos y otros datos soportan la hipótesis de que p53 mutante provee a las células características adicionales a la simple falta de p53, permitiendo mediante otros mecanismos moleculares la progresión tumoral a estadios más avanzados (Olive et al., 2004).

1.1. p53 mutante incrementa la señalización de PI3K/AKT.

Uno de los propósitos del trabajo ha sido tratar de establecer el mecanismo por el cual p53 mutante modifica/incrementa la actividad de la vía PI3K/AKT. Nosotros especulamos que en determinados puntos del desarrollo oncogénico, las células tumorales se enfrentan a un déficit de señales de supervivencia como la falta de adhesión o la escasez de señales de crecimiento. Para el presente trabajo decidimos usar un sistema modelo de *cancer stem cell* en el que pudiésemos sobre-expresar o interferir p53 mutante con el objetivo de analizar el potencial de supervivencia, proliferación y fenotipo CSC a la vez. Nuestro modelo de cultivo de *cancer stem cell* refleja un condicionamiento limitado de factores de crecimiento (donde solo usamos EGF y FGF) combinado con la falta de adhesión. De esta modo, creemos que es un buen modelo para el estudio de la dependencia de las señales de supervivencia/proliferación para las células tumorales.

Por otro lado, es ampliamente aceptado que una subpoblación tumoral es la responsable de la generación de los tumores, basado en la hipótesis que este sub-set de células tiene una capacidad intrínseca de generar el tumor y es asociado a unas características *stem*/mesenquimales. Se han intentado definir los marcadores *stem* adecuados para cada tipo de tumor, mostrando que una pequeña población es la que tiene esta capacidad. Pero, a día de hoy una mejor interpretación de esta hipótesis se basa

en la capacidad plástica de este sub-set de células de adquirir estas capacidades *stem* o inter-convertirse entre *stem* y no-*stem*. Así, gran parte de nuestras mediciones y cuantificaciones (CD133⁺ para glioblastomas o CD24^{low}/CD44^{High} para carcinoma de mama, aunque se han descrito más marcadores para ambos tipos de cánceres) no son un reflejo de una población *stem* estática, sino más bien la capacidad de las células tumorales de adquirir este fenotipo. En una gran cantidad de trabajos científicos, estas células son definidas como las responsables de iniciar el tumor y resultan un reflejo final de una población muy heterogénea que forma un tumor (Clevers, 2011; Magee et al., 2012; Scheel and Weinberg, 2011).

Nuestros resultados, usando el modelo de cultivo para CSC, muestran que la sobre-expresión de p53 mutante genera un aumento en la actividad de AKT en astrocitos primarios, potenciando el crecimiento de las células con fenotipo *stem*. En sentido inverso, hemos demostrado que la eliminación de p53 mutante, genera una pérdida significativa de la actividad de AKT, tanto en modelos tumorales de glioblastomas como en carcinoma de mama. Esto conlleva una bajada en la supervivencia celular de CSC, y una reducción en paralelo en el contenido *stem* tumoral medido a través de marcadores CSC. El papel de la vía PI3K/AKT se pone aún más de manifiesto al comprobar que gran parte del efecto en supervivencia generado por los mutantes de p53 puede revertirse utilizando inhibidores de PI3K de clase I, como el GDC-0941. Todos estos datos corroboran los resultados de otros autores donde se observa que el mutante de p53 R273H genera un incremento en la actividad de AKT en la línea de carcinoma de pulmón H1299 (Muller et al., 2009).

Además, en este trabajo demostramos que el control que ejerce p53 mutante sobre PI3K/AKT no es específico de un mutante concreto, o de un tipo celular o linaje concreto. Así, nuestros experimentos fueron realizados con diferentes mutantes de p53 tanto en células provenientes de glía como en células de tejido mamario, ya sea por expresión exógena de p53 R175H y R273H en astrocitos primarios o por eliminación de p53 mutante endógeno en U-373 MG (p53 R273H), en GBs (p53 R273H y G245R) y en MDA-MB-231 (p53 R280L).

1.2. p53 mutante genera supervivencia independiente de anclaje al inhibir BIM.

Algunos autores sugieren que las células que presentan p53 mutante se hacen dependientes de esta proteína mutada para poder mantener la supervivencia y la proliferación (Muller and Vousden, 2014), observando como la eliminación de p53 mutante incrementa la muerte celular (Braicu et al., 2013). Pero los mecanismos por los cuales la eliminación de p53 mutante genera muerte celular no están del todo definidos, habiéndose descrito que dicha muerte no sucede de una forma dependiente

de p53 *wild type* a través de BAX/PUMA/NOXA (Lim et al., 2009). De esta forma parecen existir mecanismos diferentes por los cuales la eliminación de p53 mutante puede disparar los mecanismos de muerte.

Debido a que la sobre-activación de AKT en células genera protección o al menos una mayor resistencia a algunos tipos de apoptosis (Kandel et al., 2002), nosotros proponemos que el aumento de la actividad en la vía PI3K/AKT que provoca p53 mutante podría, además de estar generando señales de supervivencia, estar bloqueando sistemas de muerte independientes de p53 *wild type*, como es la muerte a través de FoXO-BIM y la posterior activación de caspasas.

Se ha descrito por otro autores que algunos tipos de células pueden experimentar apoptosis dependiente de BIM o Bmf cuando se encuentran en suspensión o se les modifica experimentalmente los sistemas de adhesión. Además, este proceso puede ser revertido mediante la adición de señales de adhesión que proporciona la matriz extracelular a través de integrinas o mediante la activación exógena de la vía RTK-PI3K-AKT (Reginato et al., 2003; Schmelzle et al., 2007).

Así mismo, recientemente hemos demostrado que la eliminación o la reducción de AKT genera muerte y en paralelo pérdida de fenotipo CSC. En este modelo de eliminación/reducción de AKT se produce, entre otras señales, un incremento de BIM que se asocia a muerte y reducción del fenotipo CSC. Así, la posterior reducción/eliminación de BIM favorece la recuperación del fenotipo *stem*/mesenquimal y coordinadamente la recuperación de niveles de supervivencia. De estos resultados se puede proponer que la vía AKT-FoxO-BIM regula de manera coordinada las señales de supervivencia/muerte y el mantenimiento del fenotipo *stem* tumoral, al menos en el modelo tumoral de carcinoma mamario (Gargini et al., 2015).

De este modo, basándonos en las publicaciones anteriores y en nuestros resultados obtenidos, es posible proponer que determinadas mutaciones en p53 podrían generar un aumento en las señales de supervivencia. Estas señales potencian la señalización de receptores de superficie como EGFR/integrinas, lo cual genera una sobre-activación de la vía PI3K/AKT. De tal forma, finalmente se produce una inhibición de la muerte a través de FoxO-BIM-caspasas cuando la célula se encuentra sin adhesión. En el caso de los gliomas parece que el bloqueo de BIM es necesario pero no suficiente para la recuperación de niveles aceptables de proliferación. Por lo que proponemos que la vía FoxO-BIM, dependiendo del linaje tumoral, podría ser necesaria o necesaria y suficiente para un control coordinado de supervivencia, crecimiento y fenotipo CSC. En su conjunto este mecanismo puede favorecer la supervivencia, el crecimiento y el avance del tumor.

1.3. Importancia de p53 mutante: resistencia a quimioterapia.

Los tratamientos más usados en la terapia contra el cáncer son la quimioterapia y la radioterapia, pero muchos tumores presentan resistencia a este tipo de tratamientos convencionales. Está generalmente aceptado que dentro de un tumor, las células del tipo CSC muestran mayor resistencia a la radioterapia y a los quimioterapéuticos como los taxanos (Bao et al., 2006; Gupta et al., 2009). La correlación entre la presencia de p53 mutante y la resistencia a los tratamientos convencionales (quimioterapia y radioterapia) ha sido ampliamente demostrada (Bossi et al., 2006; Do et al., 2012; Masciarelli et al., 2014). Recientemente hemos descrito cómo tratamientos combinados con doxorubicina y el inhibidor de PI3K, LY294002, generan una disminución en la capacidad de formar mamoesferas secundarias en la línea de carcinoma de mama MDA-MB-231. De esta forma, observamos una disminución en la población de CSC marcadas como CD44^{High}/CD24^{Low}. Estos resultados parecen indicar que si inhibimos, por reducción de PIP₃, parte de las funciones que genera p53 mutante, como es la sobre-activación AKT, las células se sensibilizan a los tratamientos quimioterapéuticos. De hecho, en nuestro caso la doxorubicina usada a concentraciones subtóxicas, donde por sí sola no induce una muerte apreciable, al combinarse con LY294002 generó una muerte celular muy notable (Gargini et al., 2015).

Actualmente se han desarrollado un gran número de inhibidores de la vía de PI3K/AKT que están siendo evaluados en distintas fases clínicas (Baselga, 2011; Juric et al., 2015). De tal forma, consideramos importante entender los mecanismos mediante los cuales p53 mutante genera su ganancia de función e igualmente su papel en el mantenimiento de las células con fenotipo *stem*/mesenquimal tumoral, para desarrollar mejoras en las terapias anti-tumorales.

2. p53 mutante regula a WIP a través de p63 y de los receptores de superficie.

Otro de los objetivos de esta tesis era definir elementos regulados por p53 mediante los cuales p53 mutante podría estar controlando la proliferación y el mantenimiento de las CSC y con ello favorecer la transformación tumoral.

Es generalmente aceptado que distintas mutaciones en p53 se asocian o generan una mayor capacidad de supervivencia, favoreciendo la señalización de múltiples receptores de membrana (Muller et al., 2009; Muller et al., 2013). Así, muchos autores han asociado la ganancia de función oncogénica de los distintos mutantes de p53 con la regulación de múltiples genes, como por ejemplo: telomerasa (Scian et al., 2004), Slug (Wang et al., 2009), Twist (Kogan-Sakin et al., 2011), GEF-H1 (Mizuarai et al., 2006), GLUT1 (Zhang et al., 2013), p63 (Adorno et al., 2009; Muller et al., 2009), integrina $\alpha 6$ (Scian et al., 2005), integrina $\alpha 6/\beta 1$ (Muller et al., 2009), EGFR (Muller et al., 2009; Wang et al., 2013), miR-27a (Wang et al., 2013), etc.

Además de estos candidatos, en una publicación previa donde usaban microarrays de tejido tumoral, otros autores han descrito que la cantidad de mRNA de WIP co-expresa con genes asociados tanto a procesos de proliferación celular como a progresión tumoral, lo que ha sido denominado perfil génico de proliferación de Rosenwald (Rosenwald et al., 2003). Estos autores sugieren que puede existir una relación entre WIP y el fenotipo proliferativo de las células tumorales (Staub et al., 2009), por lo que analizamos si existía una correlación entre estas proteínas.

Así, nuestros primeros resultados indicaban que existía una mayor cantidad de proteína WIP en el tejido tumoral de glioblastomas al compararlo con el tejido sano. Este resultado refuerza la idea sugerida por estos autores en la que WIP puede asociarse con la patología tumoral. Esta primera observación se ha complementado con un análisis de correlación entre la presencia de p53 mutante y un aumento en la cantidad de WIP en distintas líneas tumorales (carcinoma de mama, carcinoma de colorrectal, carcinoma de ovario y glioblastomas). Aunque el número de líneas celulares y tumores diferentes no fue muy alto, nos sorprendió comprobar que la correlación entre la expresión de p53 mutante y WIP es incluso mayor que la analizada por otros autores entre p53 y CD44 (Godar et al., 2008; Powell et al., 2014) o p53 e integrinas (Freed-Pastor and Prives, 2012). Esto nos dio pie a ampliar el estudio sobre la presencia de WIP en células tumorales y su relación con p53 mutante.

Esta correlación inicial, se ve posteriormente reforzada con el dato en el que demostramos que la sobre-expresión de p53 mutante en astrocitos primarios genera un incremento en la cantidad de WIP correlativo al incremento de tumorigénesis y marcadores CSC. En contraposición, la interferencia de p53 mutante en glioblastomas (U-373 MG y GBs) y en la línea de carcinoma de mama MDA-MB-231 reduce la

cantidad de WIP, donde en paralelo, se observa una pérdida de proliferación y fenotipo CSC.

Muchos autores han descrito que p53 mutante puede regular la expresión de muchos genes de forma diferente a p53 *wild type*, modificando la cantidad de mRNA ([Kogan-Sakin et al., 2011](#); [Scian et al., 2005](#); [Scian et al., 2004](#); [Wang et al., 2013](#)). Sin embargo nosotros hemos podido comprobar que cuando interferimos p53 mutante la expresión de mRNA de WIP no se ve modificada. De esta forma creemos que en nuestro sistema p53 mutante no está regulando la cantidad de WIP a través de cambios en su transcripción.

Para establecer inequívocamente que WIP está bajo el control de p53 mutante y que además parte de la función oncogénica es debida a la actividad de WIP, comprobamos que al eliminar p53 mutante la sobre-expresión de WIP es suficiente para restablecer el crecimiento en *stem* formando neuroesferas (medidas en el glioblastoma GB4) y mamoesferas (medidas en la línea celular de carcinoma de mama MDA-MB-231).

Para determinar si estos resultados podrían tener relevancia *in vivo* hemos usado un sistema modelo de xenotransplante en ratones genéticamente inmunosuprimidos (*Nude*). De esta manera, hemos podido comprobar que la eliminación de p53 mutante en la línea celular MDA-MB-231 reduce muy significativamente la capacidad tumoral y que la sobre-expresión de WIP es capaz de restablecer el crecimiento tumoral cuando se interfiere p53 mutante.

Todos estos resultados nos permiten proponer que WIP se encuentra en las vías de señalización que son activadas por los mutantes de p53. Por tanto, WIP podría estar ligado a la ganancia de función oncogénica. Siendo esta la primera vez que se establece una relación directa entre p53 mutante y WIP.

Nuestra hipótesis es que el aumento en la cantidad de WIP podría estar mediado por la sobre-activación general de receptores de membrana asociada con las mutaciones en p53.

Como hemos mencionado anteriormente, la ganancia de función oncogénica de p53 está regulando múltiples genes y proteínas. Pero, en pocos de estos trabajos se ha podido comprobar el restablecimiento de la función oncogénica cuando p53 mutante es eliminado, como es el caso de sh-miR-27a ([Wang et al., 2013](#)). Distintos autores describen cómo p53 mutante realiza parte de su función oncogénica mediante la unión a p63, generando de esta forma una inhibición en las funciones supresoras tumorales de p63. Así, se ha descrito que la interferencia de p63 simula el efecto que se genera con los mutantes de p53, promoviendo en ambos casos un incremento en la

migración, invasión y metástasis ([Adorno et al., 2009](#); [Muller et al., 2009](#)). Estos y otros datos similares han apoyado la idea generalizada de que la mutación de p53 y la disfunción de p63 van unidas.

Asumiendo esta hipótesis, era obvio pensar que p63 podría estar regulando también a WIP en nuestros sistemas. Así, hemos podido demostrar que cuando eliminamos p53 mutante se produce una caída en los niveles de WIP que pueden restablecerse con la interferencia de p63.

De este modo, podemos proponer que WIP está siendo regulado por p53 mutante a través de p63. Esto refuerza más aún la hipótesis de que las mutaciones en p53 tienen una profunda asociación con p63, como ha sido descrito ([Adorno et al., 2009](#); [Muller et al., 2009](#)). Estos autores proponen que la interacción p53 mutante/p63 genera la disfunción de p63 impidiendo parte de sus funciones normales por secuestro o modificación de sus interacciones. De esta manera, esto supone un incremento en la actividad de receptores de membrana, favoreciendo un mejor acoplamiento del reciclaje de receptores, como EGFR e integrina $\alpha 6/\beta 1$. Esto va a promover finalmente un incremento en la proliferación y migración y, dependiendo del tipo de tumor, un aumento en la invasión y desarrollo de metástasis ([Muller et al., 2009](#)).

De hecho, en nuestros resultados hemos podido ver como la eliminación de p53 mutante en glioblastomas genera una disminución en la cantidad de integrina $\alpha 6$ en membrana. También hemos sido capaces de comprobar que la sobre-expresión de receptores de superficie (EGFR e integrina $\beta 1$) genera un restablecimiento en el crecimiento de neuroesferas cuando p53 mutante es eliminado, siendo mayor el efecto con la combinación de ambos receptores. Además, hemos podido establecer que la sobre-expresión exógena de integrina $\beta 1$ es capaz de restablecer los niveles de WIP cuando p53 mutante es eliminado.

Con esta serie de resultados obtenidos consideramos que podemos proponer que p53 mutante a través de p63, o en coordinación con p63, regula a WIP mediante un aumento en las señales de receptores de membrana.

A partir de estos datos hemos pretendido establecer la conexión entre esta señalización de receptores de membrana con la regulación de WIP. Por un lado hemos ya descrito que la función p53 mutante recae en la actividad PI3K/AKT para el mantenimiento de la capacidad de proliferación y el fenotipo CSC. Parece obvio pensar que esta vía debería de ser una de las que son sobre-activadas por los receptores de membrana tirosina quinasa e integrinas, tras la activación oncogénica p53 mutante/p63. Además, recientemente una de las isoformas de AKT, AKT2, se ha asociado con el reciclaje de las integrinas mediada por la proteína acoplada a Rab

(RCP), siendo AKT2 importante en la migración e invasión regulada por este sistema (Jacquemet et al., 2013). Varios autores han intentado establecer una implicación diferencial de las distintas isoformas de AKT, donde podría concluirse que AKT2 podría estar involucrado en los procesos metastásicos en cáncer de colon (Rychahou et al., 2008) y en neuroblastomas (Qiao et al., 2013).

Por tanto nos preguntamos si la modificación de la expresión de las distintas isoformas de AKT se podría reflejar en WIP. Nuestros resultados demuestran que en las células ensayadas que expresan tanto AKT1 como AKT2, solo la eliminación de AKT2 reduce específicamente los niveles de WIP y a la vez produce una inhibición en el crecimiento y el fenotipo CSC.

De todos estos datos, podemos proponer que la ganancia de función oncogénica generada por p53 mutante/63 promueve un incremento de señales de reciclaje y un incremento de señalización de receptores de membrana (integrina y RTK). Además, a través de la señalización PI3K/AKT, y específicamente de AKT2, se genera y potencia señales que sostienen o producen niveles altos de WIP, esenciales para el mantenimiento de la proliferación y fenotipo CSC (esquema del modelo en **figura D1**).

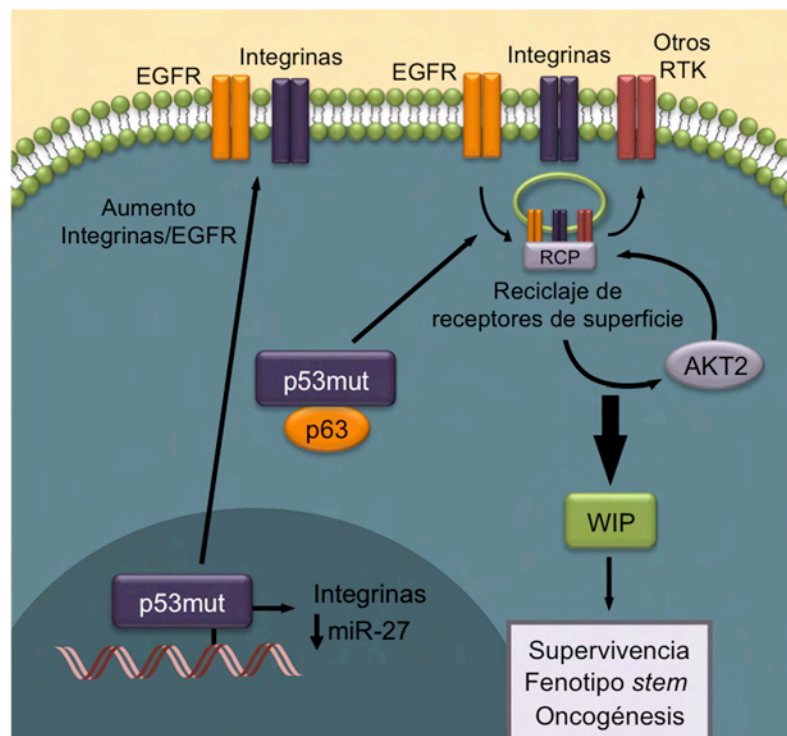


Figura D1. Modelo de regulación entre p53 mutante y WIP.

Debido a que nuestro trabajo se ciñe a modelos de GB y carcinoma de mama, no podemos descartar que en otro tipo tumoral la importancia de las integrinas y RTK sea diferente; o que en linajes tumorales con diferente estatus de isoformas de AKT, AKT2 no sea la única esencial en el proceso de mantenimiento de niveles altos de WIP.

3. WIP media la estabilización de YAP/TAZ.

Uno de los resultados más relevantes que hemos obtenido es que la expresión de p53 mutante o de WIP incrementa los niveles de YAP/TAZ. De forma complementaria, la interferencia de p53 mutante o de WIP favorece la degradación de YAP/TAZ, siendo cuantitativamente similar en ambos casos. Además, hemos podido comprobar que esta degradación ocurre a través de proteosoma.

De hecho la degradación de YAP/TAZ ha sido descrita como dependiente de proteosoma, tanto en células tumorales como en parte de la fisiología normal de algunas células y en toda la escala evolutiva desde *Drosophila* hasta mamíferos ([Moroishi et al., 2015](#)). Existen muchos trabajos que han definido el mecanismo de regulación de YAP/TAZ, y gran parte de estos trabajos se han centrado en la vía denominada HIPPO.

Esta vía de señalización, inicialmente descrita en *Drosophila*, está altamente conservada y está controlada en parte por una serie de quinasas, LATS y Mst, que pueden fosforilar a YAP/TAZ. Esta serie de fosforilaciones puede condicionar a YAP/TAZ hacia la unión con otras proteínas (por ejemplo con actina, AMOT o 14-3-3), impidiendo su tránsito nuclear o predisponiéndolas para su degradación ([Grosse and Vartiainen, 2013](#); [Liu et al., 2010](#); [Moroishi et al., 2015](#); [Piccolo et al., 2014](#); [Yu and Guan, 2013](#); [Zhao et al., 2010](#)). Además, muchos tipos de vías de señalización han sido implicadas en la regulación de YAP/TAZ. De particular interés para la regulación de p53 mutante son los datos que han relacionado la señalización de integrinas con el tráfico nuclear de YAP/TAZ ([Serrano et al., 2013](#); [Tang et al., 2013](#)). Más recientemente, se ha descrito que la degradación de YAP/TAZ puede estar ligada a la de β -catenina. De esta forma, el mismo complejo de degradación axin-APC-GSK3-CK1, de la vía de Wnt, podrían ser el responsable de la estabilización/degradación de YAP/TAZ y de β -catenina. Así, estos factores de transcripción generarían una sinergia o cooperatividad en la ganancia de función tumoral de características *stem*/mesenquimales ([Azzolin et al., 2014](#); [Azzolin et al., 2012](#)).

Tanto la degradación como el secuestro de YAP/TAZ en el citoplasma condicionarán su tránsito nuclear. Si bien, en algunos de estos trabajos es difícil discernir cuánto del control es mediado por degradación y cuánto lo es por bloqueo de su tránsito nuclear. Por otro lado, el grupo de Kun-Liang Guan ha demostrado que YAP/TAZ es regulado por HIPPO en ausencia de adhesión, bloqueando de esta forma el tránsito nuclear y la transcripción. Además, restablecen gran parte de estos procesos mediante la eliminación de LATS ([Zhao et al., 2012](#)).

Si bien en el presente trabajo no se ha hecho un análisis exhaustivo de la relación de WIP con la vía HIPPO, si hemos podido observar que la eliminación de

p53 mutante no induce un aumento de la fosforilación de YAP en la serina 127, dependiente de LATS. Esto nos podría permitir especular que la eliminación de p53 mutante no induce una mayor activación de la vía HIPPO, si bien esto necesitaría un abordaje específico en el futuro.

Alternativamente a la vía HIPPO, se ha descrito la regulación de YAP/TAZ por mecano-transducción a través de un mecanismo sensiblemente diferente ([Dupont et al., 2011](#)). Estos autores ponen de manifiesto que proteínas reguladoras de actina, como son RhoA, ROCK y Miosinas, al igual que superficies de baja adhesión o también de moduladores como Gelsolina, Cofilina o Cap-Z ([Aragona et al., 2013](#)), modifican la transcripción nuclear dependiente de YAP/TAZ. Así, por ejemplo, estos autores demostraron que inhibidores de la polimerización de actina (como Latrunculina A) bloquean el tránsito nuclear de YAP/TAZ, relacionando directamente la tensión que genera el citoesqueleto de actina con la actividad de YAP/TAZ ([Piccolo et al., 2014](#)).

Esto nos indica un elemento de regulación importante como es el tránsito nuclear de YAP/TAZ, esencial para su actividad de cofactor de transcripción y el estado de polimerización de actina. Recordemos que WIP es una proteína que interacciona de forma directa con N-WASP y el complejo de polimerización de actina Arp2/3. Además contiene múltiples dominios de interacción y la regulación que genera sobre el citoesqueleto de actina sigue en constante debate ([Anton et al., 2007](#); [Campellone and Welch, 2010](#)). WIP ha sido implicado en múltiples procesos celulares, entre los más destacados para el cáncer pueden citarse su implicación en migración o la formación del invadopodia, una estructura relativa a la invasión celular ([Banon-Rodriguez et al., 2013](#); [Garcia et al., 2014](#); [King et al., 2011](#)). De hecho han demostrado que WIP-N-WASP es capaz de favorecer el tránsito nuclear de MRTF-SRF (*myocardin-related transcription factor-serum response factor*) debido a su capacidad de estimular la polimerización de actina ([Ramesh et al., 2014](#)). Con estos datos sería tentador proponer que WIP modula el tránsito nuclear de YAP/TAZ a través del control de la polimerización de actina, de forma análoga a MRTF-SRF.

En experimentos preliminares, hemos observado que la estabilidad de YAP/TAZ no se ve afectada por inhibidores de la polimerización de actina como Latrunculina A o la Citocalasina en nuestros modelos celulares, pero sí observamos que estas drogas disminuyen los niveles de YAP/TAZ nuclear. De esta forma, la modificación de la polimerización de actina, que afecta al ratio actina-F/G, puede afectar al tránsito nuclear y la consecuente transcripción de YAP/TAZ, como ya han publicado algunos autores ([Piccolo et al., 2014](#)).

Así, nuestros datos muestran una correlación entre mayor cantidad de WIP y una mayor estabilidad de la proteína, lo que significa mayor cantidad de YAP/TAZ y

mayor tránsito nuclear y actividad transcripcional, favoreciendo características tumorales y el establecimiento del fenotipo *stem*/mesenquimal. Además, experimentos preliminares sugieren que esta estabilización de YAP/TAZ mediada por WIP es insensible a actina-G. Nosotros hipotetizamos que gran parte de la estabilización que genera WIP sobre YAP/TAZ es mediada por la inhibición en el complejo de degradación Axin-APC-GSK3.

Si esto último fuera finalmente así, nos permitiría proponer como hipótesis de trabajo donde las funciones de WIP relacionadas con la regulación de actina no son aquellas que determinarían la estabilidad de YAP/TAZ, y por tanto la cantidad final disponible. Por el contrario, en un segundo nivel de regulación, la actina-F/G regularía el tránsito nuclear de YAP/TAZ (según se describe en el la **figura D2**).

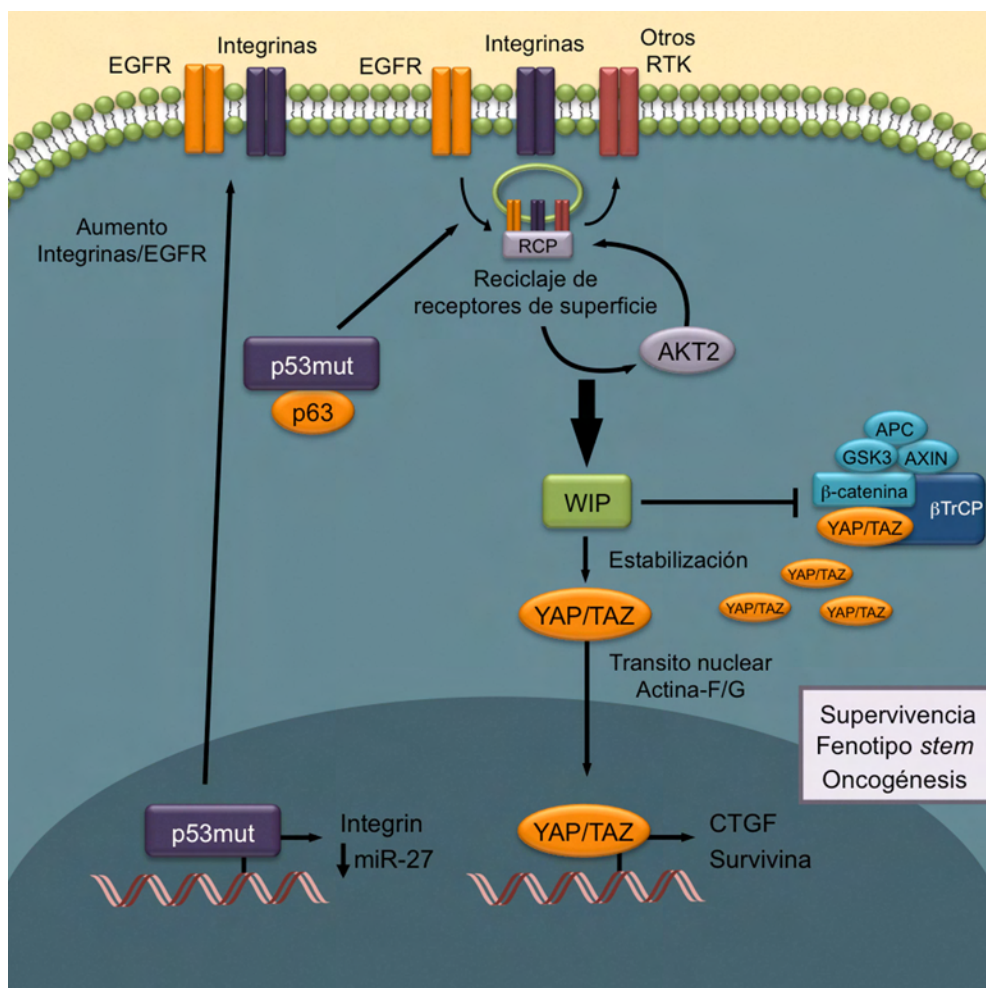


Figura D2. Modelo de regulación oncogénica de p53 mutante y WIP que recae sobre YAP/TAZ

Nuestros resultados demuestran que la eliminación de WIP disminuye el crecimiento de las células. Estos datos suponen la primera demostración de que WIP está implicado en el crecimiento celular en mamíferos y además este proceso es asociado a la patología del cáncer, como puede interpretarse de la correlación en la expresión de p53 mutante y WIP.

3.1. p53 y la ruta del mevalonato.

Recientemente han sido publicados varios datos indicando que la ganancia de función oncogénica de p53 generan una regulación positiva de la vía de síntesis del colesterol. En concreto se ha descrito que algunas de las mutaciones en p53 regulan genes involucrados en la ruta del SREBP/mevalonato ([Freed-Pastor et al., 2012](#)). Más recientemente se ha descrito que tanto la regulación de la ruta del mevalonato (en concreto mediante la inhibición por estatinas) como la eliminación de p53 mutante controlan el tránsito nuclear de YAP/TAZ. Estos autores muestran que la geranilación es la responsable del efecto sobre la actividad de RhoA, que a través de la vía HIPPO, regularía la entrada del complejo YAP/TAZ al núcleo ([Sorrentino et al., 2014](#)).

Sin embargo, nuestros datos indican que, en nuestras condiciones de cultivo en suspensión, la inhibición con estatinas no afecta significativamente a la cantidad de YAP/TAZ, ni a la transcripción de genes dianas de YAP/TAZ como Survivina, ni a la cantidad de WIP presente en los tipos celulares analizados (astrocitos primarios y GBs). Igualmente no observamos que la inhibición con estatinas (Simvastatina) modifique el efecto generado por p53 mutante. En cambio, sí que observamos que en situaciones de cultivos más similares a las suyas (línea celular MDA-MB-231 en adhesión) la cantidad de YAP/TAZ nuclear parece verse reducida con la inhibición mediante estatinas. Creemos que esta aparente disparidad de resultados podría ser debida a la diferencia de modelos, adheridos *versus* suspensión, o también a la combinación de modelos de adhesión y diferentemente factores tróficos usados en ambos experimentos. Solo el análisis más en profundidad de ambos modelos permitirá definir en el futuro la dependencia relativa entre colesterol/geranilo y YAP/TAZ.

En conclusión, nuestros datos en su conjunto nos permiten establecer un modelo en el que las mutaciones de p53 generan una serie de modificaciones celulares, como son el aumento de la señalización y el reciclaje de receptores, dependiente de p63. Este incremento de señalización conlleva la activación de la vía PI3K/AKT, siendo en concreto AKT2 la encargada de mantener niveles altos de WIP.

Este incremento en WIP produce una estabilización de los cofactores de transcripción YAP/TAZ, resultando este efecto esencial para la proliferación y el mantenimiento del fenotipo CSC y la progresión tumoral. Además, la sobre-expresión de WIP es suficiente para restablecer el fenotipo tumoral que se pierde al eliminar p53 mutante.

Proponemos, por tanto, que la inhibición de WIP es una posible nueva diana terapéutica en los tipos de tumores aquí analizados y que el análisis de los niveles de WIP podría de esta forma convertirse incluso en un nuevo biomarcador de progresión tumoral.

Conclusiones

1. p53 mutante es necesario para la supervivencia celular y el mantenimiento del fenotipo CSC, tanto en glioblastomas como en carcinomas de mama.
2. Parte del efecto que genera p53 mutante en las CSC lo ejerce mediante el manteniendo de la actividad de la vía PI3K/AKT.
3. Hemos podido describir que WIP es uno de los elementos regulados por p53 mutante y gran parte de la función oncogénica que realiza p53 mutante recae sobre WIP tanto *in vitro* como *in vivo*.
4. WIP realiza su función pro-oncogénica regulando la estabilidad y el transito nuclear de YAP/TAZ, lo que favorece el mantenimiento y crecimiento de células con fenotipo *stem*/mesenquimal.
5. WIP y TAZ no son regulados transcripcionalmente por p53 mutante. Además, la eliminación de p53 mutante o la de WIP genera una degradación de TAZ a través del proteosoma.
6. En contraste con lo recientemente publicado, la ruta del mevalonato no parece regular a YAP/TAZ ni a WIP, al menos en condiciones de cultivos CSC para glioblastomas y carcinomas de mama analizados.
7. p53 mutante y WIP son necesarios para generar la capacidad invasiva en tumores de glioblastomas crecidos en 3D/Matrigel.
8. p53 mutante coopera con WIP y con YAP/TAZ potenciando el crecimiento de las células CSC en suspensión y en agar blando.
9. La sobre-expresión exógena de integrina $\beta 1$ o EGFR permiten recuperar los niveles de WIP y de TAZ cuando p53 mutante es eliminado, siendo necesaria la presencia de WIP para el restablecimiento de TAZ.
10. En el modelo de glioblastoma analizado, los niveles de WIP están controlados por la actividad de PI3K de clase I, en concreto por la isoforma AKT2.

Bibliografía

- Adorno, M., Cordenonsi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M.B., Guzzardo, V., *et al.* (2009). A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* **137**, 87-98.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3983-3988.
- Alexandrova, E.M., Yallowitz, A.R., Li, D., Xu, S., Schulz, R., Proia, D.A., Lozano, G., Dobbelstein, M., and Moll, U.M. (2015). Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature*.
- Anton, I.M., de la Fuente, M.A., Sims, T.N., Freeman, S., Ramesh, N., Hartwig, J.H., Dustin, M.L., and Geha, R.S. (2002). WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* **16**, 193-204.
- Anton, I.M., Jones, G.E., Wandosell, F., Geha, R., and Ramesh, N. (2007). WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends in cell biology* **17**, 555-562.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* **154**, 1047-1059.
- Askham, J.M., Platt, F., Chambers, P.A., Snowden, H., Taylor, C.F., and Knowles, M.A. (2010). AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene* **29**, 150-155.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., *et al.* (2014). YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**, 157-170.
- Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* **151**, 1443-1456.
- Banon-Rodriguez, I., Saez de Guinoa, J., Bernardini, A., Ragazzini, C., Fernandez, E., Carrasco, Y.R., Jones, G.E., Wandosell, F., and Anton, I.M. (2013). WIP regulates persistence of cell migration and ruffle formation in both mesenchymal and amoeboid modes of motility. *PloS one* **8**, e70364.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760.
- Baselga, J. (2011). Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *The oncologist* **16 Suppl 1**, 12-19.
- Bhaskar, P.T., and Hay, N. (2007). The two TORCs and Akt. *Developmental cell* **12**, 487-502.
- Bhat, K.P., Salazar, K.L., Balasubramanian, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., James, J.D., Gumin, J., Diefes, K.L., Kim, S.H., *et al.* (2011). The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes & development* **25**, 2594-2609.
- Bid, H.K., Roberts, R.D., Cam, M., Audino, A., Kurmasheva, R.T., Lin, J., Houghton, P.J., and Cam, H. (2014). DeltaNp63 promotes pediatric neuroblastoma and osteosarcoma by regulating tumor angiogenesis. *Cancer research* **74**, 320-329.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* **348 Pt 2**, 241-255.

- Bossi, G., Lapi, E., Strano, S., Rinaldo, C., Blandino, G., and Sacchi, A. (2006). Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene* 25, 304-309.
- Braicu, C., Pileczki, V., Irimie, A., and Berindan-Neagoe, I. (2013). p53siRNA therapy reduces cell proliferation, migration and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 381, 61-68.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., *et al.* (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155, 462-477.
- Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature reviews. Cancer* 9, 701-713.
- Burger, H., Nooter, K., Boersma, A.W., Kortland, C.J., and Stoter, G. (1997). Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 73, 592-599.
- Burns, S., Cory, G.O., Vainchenker, W., and Thrasher, A.J. (2004). Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 104, 3454-3462.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 237-251.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science (New York, N.Y.)* 281, 1677-1679.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.
- Carpén, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., *et al.* (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439-444.
- Chen, C.H., Chang, Y.J., Ku, M.S., Chung, K.T., and Yang, J.T. (2011). Enhancement of temozolomide-induced apoptosis by valproic acid in human glioma cell lines through redox regulation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 89, 303-315.
- Chen, M.L., Xu, P.Z., Peng, X.D., Chen, W.S., Guzman, G., Yang, X., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., and Hay, N. (2006). The deficiency of Akt1 is sufficient to suppress tumor development in Pten^{+/-} mice. *Genes & development* 20, 1569-1574.
- Chou, H.C., Anton, I.M., Holt, M.R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., and Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Current biology : CB* 16, 2337-2344.
- Choudhury, A.R., Ju, Z., Djojosebroto, M.W., Schienke, A., Lechel, A., Schaetzlein, S., Jiang, H., Stepczynska, A., Wang, C., Buer, J., *et al.* (2007). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nature genetics* 39, 99-105.
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Briskin, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 138, 1083-1095.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* 17, 313-319.

- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* 65, 10946-10951.
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A., *et al.* (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147, 759-772.
- Cottini, F., Hideshima, T., Xu, C., Sattler, M., Dori, M., Agnelli, L., ten Hacken, E., Bertilaccio, M.T., Antonini, E., Neri, A., *et al.* (2014). Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. *Nature medicine* 20, 599-606.
- Crook, T., Nicholls, J.M., Brooks, L., O'Nions, J., and Allday, M.J. (2000). High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* 19, 3439-3444.
- Curto, M., Cole, B.K., Lallemand, D., Liu, C.H., and McClatchey, A.I. (2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of cell biology* 177, 893-903.
- Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine* 58, 267-284.
- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., *et al.* (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739-744.
- Das, S., and Marsden, P.A. (2013). Angiogenesis in glioblastoma. *The New England journal of medicine* 369, 1561-1563.
- Datta, K., Babbar, P., Srivastava, T., Sinha, S., and Chattopadhyay, P. (2002). p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 148-157.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 2420-2424.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A.J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nature genetics* 4, 42-46.
- Do, P.M., Varanasi, L., Fan, S., Li, C., Kubacka, I., Newman, V., Chauhan, K., Daniels, S.R., Bocchetta, M., Garrett, M.R., *et al.* (2012). Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes & development* 26, 830-845.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
- Dummler, B., and Hemmings, B.A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society transactions* 35, 231-235.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-649.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the

- tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation* 15, 504-514.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 46, 765-781.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
- Freed-Pastor, W.A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerod, A., Moon, S.H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., *et al.* (2012). Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* 148, 244-258.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development* 26, 1268-1286.
- Garcia, E., Jones, G.E., Machesky, L.M., and Anton, I.M. (2012). WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *European journal of cell biology* 91, 869-877.
- Garcia, E., Machesky, L.M., Jones, G.E., and Anton, I.M. (2014). WIP is necessary for matrix invasion by breast cancer cells. *European journal of cell biology* 93, 413-423.
- Gargini, R., Cerliani, J.P., Escoll, M., Anton, I.M., and Wandosell, F. (2015). Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway. *Stem cells* 33, 646-660.
- Georgescu, M.M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes & cancer* 1, 1170-1177.
- Godar, S., Ince, T.A., Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F., *et al.* (2008). Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134, 62-73.
- Gonzalez, E., and McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.) 8, 2502-2508.
- Grosse, R., and Vartiainen, M.K. (2013). To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 693-697.
- Gu, X., Zerbini, L.F., Otu, H.H., Bhasin, M., Yang, Q., Joseph, M.G., Grall, F., Onatunde, T., Correa, R.G., and Libermann, T.A. (2007). Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer research* 67, 4219-4226.
- Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A., and Lander, E.S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645-659.
- Gutmann, D.H., Giordano, M.J., Fishback, A.S., and Guha, A. (1997). Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 49, 267-270.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., Rosenblum, M.K., Pandolfi, P.P., Manova-Todorova, K., and Holland, E.C. (2008). PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes & development* 22, 436-448.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 690-701.
- Jacquemet, G., Green, D.M., Bridgewater, R.E., von Kriegsheim, A., Humphries, M.J., Norman, J.C., and Caswell, P.T. (2013). RCP-driven alpha5beta1 recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1-IQGAP1 complex. *The Journal of cell biology* 202, 917-935.
- Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in cancer research* 102, 19-65.
- Ju, X., Katiyar, S., Wang, C., Liu, M., Jiao, X., Li, S., Zhou, J., Turner, J., Lisanti, M.P., Russell, R.G., *et al.* (2007). Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7438-7443.
- Juric, D., Castel, P., Griffith, M., Griffith, O.L., Won, H.H., Ellis, H., Ebbesen, S.H., Ainscough, B.J., Ramu, A., Iyer, G., *et al.* (2015). Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)Kalpha inhibitor. *Nature* 518, 240-244.
- Kalo, E., Buganim, Y., Shapira, K.E., Besserglick, H., Goldfinger, N., Weisz, L., Stambolsky, P., Henis, Y.I., and Rotter, V. (2007). Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Molecular and cellular biology* 27, 8228-8242.
- Kandel, E.S., Skeen, J., Majewski, N., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Feliciano, C.S., Gartel, A., and Hay, N. (2002). Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Molecular and cellular biology* 22, 7831-7841.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., *et al.* (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339.
- Kang, H.J., Choi, Y.S., Hong, S.B., Kim, K.W., Woo, R.S., Won, S.J., Kim, E.J., Jeon, H.K., Jo, S.Y., Kim, T.K., *et al.* (2004). Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 1280-1287.
- King, S.J., Worth, D.C., Scales, T.M., Monypenny, J., Jones, G.E., and Parsons, M. (2011). beta1 integrins regulate fibroblast chemotaxis through control of N-WASP stability. *The EMBO journal* 30, 1705-1718.
- Kleihues, P., Schauble, B., zur Hausen, A., Esteve, J., and Ohgaki, H. (1997). Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *The American journal of pathology* 150, 1-13.
- Kogan-Sakin, I., Tabach, Y., Buganim, Y., Molchadsky, A., Solomon, H., Madar, S., Kamer, I., Stambolsky, P., Shelly, A., Goldfinger, N., *et al.* (2011). Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells. *Cell death and differentiation* 18, 271-281.
- Korkaya, H., Paulson, A., Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Brown, M., Dutcher, J., Clouthier, S.G., and Wicha, M.S. (2009). Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS biology* 7, e1000121.
- Kruse, J.P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega,

- Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., *et al.* (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 861-872.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer* 9, 749-758.
- Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., and Shaul, Y. (2008). Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage. *Molecular cell* 29, 350-361.
- Li, A., Dawson, J.C., Forero-Vargas, M., Spence, H.J., Yu, X., Konig, I., Anderson, K., and Machesky, L.M. (2010). The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Current biology : CB* 20, 339-345.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* 67, 1030-1037.
- Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C.C., Kaczmarek, M., and Zhan, X. (2001). Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer research* 61, 6906-6911.
- Lim, L.Y., Vidnovic, N., Ellisen, L.W., and Leong, C.O. (2009). Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *British journal of cancer* 101, 1606-1612.
- Lin, A.L., and Gutmann, D.H. (2013). Advances in the treatment of neurofibromatosis-associated tumours. *Nature reviews. Clinical oncology* 10, 616-624.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., *et al.* (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF{beta}-TrCP E3 ligase. *The Journal of biological chemistry* 285, 37159-37169.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 8, 627-644.
- Liu, X.Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D.A., Fontebasso, A.M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzentruber, J., Majewski, J., *et al.* (2012). Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta neuropathologica* 124, 615-625.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114, 97-109.
- Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell* 21, 283-296.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., and DePinho, R.A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development* 15, 1311-1333.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer* 3, 459-465.

- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Masciarelli, S., Fontemaggi, G., Di Agostino, S., Donzelli, S., Carcarino, E., Strano, S., and Blandino, G. (2014). Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene* 33, 1601-1608.
- Michael, D., and Oren, M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in cancer biology* 13, 49-58.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398, 708-713.
- Mizuarai, S., Yamanaka, K., and Kotani, H. (2006). Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer research* 66, 6319-6326.
- Mo, J.S., Park, H.W., and Guan, K.L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports* 15, 642-656.
- Moore, K., and Kim, L. (2010). Primary Brain Tumors: Characteristics, Practical Diagnostic and Treatment Approaches. in *Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies*. ed. S.K. Ray.
- Moroishi, T., Hansen, C.G., and Guan, K.L. (2015). The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nature reviews. Cancer* 15, 73-79.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- Muller, P.A., Caswell, P.T., Doyle, B., Iwanicki, M.P., Tan, E.H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D.A., Ludwig, R.L., Gosselin, P., *et al.* (2009). Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* 139, 1327-1341.
- Muller, P.A., Trinidad, A.G., Caswell, P.T., Norman, J.C., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 regulates Dicer through p63-dependent and -independent mechanisms to promote an invasive phenotype. *The Journal of biological chemistry* 289, 122-132.
- Muller, P.A., Trinidad, A.G., Timpson, P., Morton, J.P., Zanivan, S., van den Berghe, P.V., Nixon, C., Karim, S.A., Caswell, P.T., Noll, J.E., *et al.* (2013). Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. *Oncogene* 32, 1252-1265.
- Muller, P.A., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology* 15, 2-8.
- Muller, P.A., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell* 25, 304-317.
- Mure, H., Matsuzaki, K., Kitazato, K.T., Mizobuchi, Y., Kuwayama, K., Kageji, T., and Nagahiro, S. (2010). Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas. *Neuro-oncology* 12, 221-232.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.
- O'Hayre, M., Degese, M.S., and Gutkind, J.S. (2014). Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Current opinion in cell biology* 27, 126-135.

- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology* 170, 1445-1453.
- Okada, M., Wang, Y., Jang, S.W., Tang, X., Neri, L.M., and Ye, K. (2009). Akt phosphorylation of merlin enhances its binding to phosphatidylinositols and inhibits the tumor-suppressive activities of merlin. *Cancer research* 69, 4043-4051.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847-860.
- Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651.
- Park, J.I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., *et al.* (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66-72.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews* 94, 1287-1312.
- Pietras, A., Katz, A.M., Ekstrom, E.J., Wee, B., Halliday, J.J., Pitter, K.L., Werbeck, J.L., Amankulor, N.M., Huse, J.T., and Holland, E.C. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell stem cell* 14, 357-369.
- Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B., and Murphy, M.E. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27, 6507-6521.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research* 65, 5506-5511.
- Powell, E., Piwnica-Worms, D., and Piwnica-Worms, H. (2014). Contribution of p53 to metastasis. *Cancer discovery* 4, 405-414.
- Pulkkanen, K.J., and Yla-Herttuala, S. (2005). Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12, 585-598.
- Qiao, J., Lee, S., Paul, P., Qiao, L., Taylor, C.J., Schlegel, C., Colon, N.C., and Chung, D.H. (2013). Akt2 regulates metastatic potential in neuroblastoma. *PloS one* 8, e56382.
- Ramesh, N., Anton, I.M., Hartwig, J.H., and Geha, R.S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14671-14676.
- Ramesh, N., Massaad, M.J., Kumar, L., Koduru, S., Sasahara, Y., Anton, I., Bhasin, M., Libermann, T., and Geha, R. (2014). Binding of the WASP/N-WASP-interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. *Molecular and cellular biology* 34, 2600-2610.
- Ray-Chaudhury, A. (2010). Pathology of Glioblastoma Multiforme. in *Glioblastoma Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies*. ed. S.K. Ray
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature cell biology* 5, 733-740.

- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)* 255, 1707-1710.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters* 332, 237-248.
- Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., *et al.* (2012). beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 151, 1457-1473.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., *et al.* (2003). The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer cell* 3, 185-197.
- Rotter, V. (1983). p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 2613-2617.
- Rychahou, P.G., Kang, J., Gulhati, P., Doan, H.Q., Chen, L.A., Xiao, S.Y., Chung, D.H., and Evers, B.M. (2008). Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 20315-20320.
- Scheel, C., and Weinberg, R.A. (2011). Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *International journal of cancer. Journal international du cancer* 129, 2310-2314.
- Schmelzle, T., Mailloux, A.A., Overholtzer, M., Carroll, J.S., Solimini, N.L., Lightcap, E.S., Veiby, O.P., and Brugge, J.S. (2007). Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3787-3792.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Anderson, M.A., Hassan, S., Bowman, M., Miles, M.F., Deb, S.P., and Deb, S. (2005). Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Molecular and cellular biology* 25, 10097-10110.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Deb, D., Ellis, M.A., Carchman, E.H., Das, A., Valerie, K., Deb, S.P., and Deb, S. (2004). Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene* 23, 4430-4443.
- Serrano, I., McDonald, P.C., Lock, F., Muller, W.J., and Dedhar, S. (2013). Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nature communications* 4, 2976.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., Manfrin, A., Ingallina, E., Sommaggio, R., Piazza, S., *et al.* (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature cell biology* 16, 357-366.
- Staub, E., Groene, J., Heinze, M., Mennerich, D., Roepcke, S., Klamann, I., Hinzmann, B., Castanos-Velez, E., Pilarsky, C., Mann, B., *et al.* (2009). An expression module

- of WIPF1-coexpressed genes identifies patients with favorable prognosis in three tumor types. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87, 633-644.
- Strano, S., Dell'Orso, S., Di Agostino, S., Fontemaggi, G., Sacchi, A., and Blandino, G. (2007). Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* 26, 2212-2219.
- Su, X., Chakravarti, D., and Flores, E.R. (2013). p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nature reviews. Cancer* 13, 136-143.
- Tang, Y., Rowe, R.G., Botvinick, E.L., Kurup, A., Putnam, A.J., Seiki, M., Weaver, V.M., Keller, E.T., Goldstein, S., Dai, J., *et al.* (2013). MT1-MMP-dependent control of skeletal stem cell commitment via a beta1-integrin/YAP/TAZ signaling axis. *Developmental cell* 25, 402-416.
- Terzian, T., Suh, Y.A., Iwakuma, T., Post, S.M., Neumann, M., Lang, G.A., Van Pelt, C.S., and Lozano, G. (2008). The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes & development* 22, 1337-1344.
- Thompson, E.W., and Haviv, I. (2011). The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nature medicine* 17, 1048-1049.
- Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R.C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F.D., and Guan, K.L. (2012). YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nature cell biology* 14, 1322-1329.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829-833.
- Wang, S.P., Wang, W.L., Chang, Y.L., Wu, C.T., Chao, Y.C., Kao, S.H., Yuan, A., Lin, C.W., Yang, S.C., Chan, W.K., *et al.* (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nature cell biology* 11, 694-704.
- Wang, W., Cheng, B., Miao, L., Mei, Y., and Wu, M. (2013). Mutant p53-R273H gains new function in sustained activation of EGFR signaling via suppressing miR-27a expression. *Cell death & disease* 4, e574.
- Wang, Y., Suh, Y.A., Fuller, M.Y., Jackson, J.G., Xiong, S., Terzian, T., Quintas-Cardama, A., Bankson, J.A., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. (2011). Restoring expression of wild-type p53 suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in mice with a p53 missense mutation. *The Journal of clinical investigation* 121, 893-904.
- Weissmueller, S., Manchado, E., Saborowski, M., Morris, J.P.t., Wagenblast, E., Davis, C.A., Moon, S.H., Pfister, N.T., Tschaharganeh, D.F., Kitzing, T., *et al.* (2014). Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell* 157, 382-394.
- Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. *Molecular and cellular biology* 4, 1402-1410.
- Xie, T.X., Zhou, G., Zhao, M., Sano, D., Jasser, S.A., Brennan, R.G., and Myers, J.N. (2013). Serine substitution of proline at codon 151 of TP53 confers gain of function activity leading to anoikis resistance and tumor progression of head and neck cancer cells. *The Laryngoscope* 123, 1416-1423.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., *et al.* (2000). p73-deficient mice have

- neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99-103.
- Yu, F.X., and Guan, K.L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development* **27**, 355-371.
- Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., *et al.* (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780-791.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497-5510.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 123-129.
- Zhang, C., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Zhao, Y., Hong, X., Lin, M., Yu, H., Liu, L., Levine, A.J., *et al.* (2013). Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature communications* **4**, 2935.
- Zhao, B., Li, L., Lei, Q., and Guan, K.L. (2010a). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & development* **24**, 862-874.
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010b). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & development* **24**, 72-85.
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.Y., Yu, J., and Guan, K.L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & development* **26**, 54-68.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., *et al.* (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development* **21**, 2747-2761.

Anexo

Relación de publicaciones de la doctoranda relacionadas con esta tesis:

Gargini R., Cerliani JP., **Escoll M.**, Antón IM, Wandosell F. (2015). Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway.

Stem Cells. 33, 646-60.

Escoll M., et al., (2015). WASP-interaction protein (WIP) is a key regulator of the oncogenic function of mutant p53.

Manuscrito en preparación.

Cancer Stem Cell-Like Phenotype and Survival Are Coordinately Regulated by Akt/FoxO/Bim Pathway

RICARDO GARGINI,^{a,b,c} JUAN P. CERLIANI,^d MARIBEL ESCOLL,^{a,c} INÉS M. ANTÓN,^{b,c} FRANCISCO WANDOSELL^{a,c}

Key Words. Cancer stem cells • Cell signaling • Apoptosis • Breast cancer • Signal transduction

^aCentro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma Madrid, Madrid, Spain; ^bCentro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), C/Darwin 3, Madrid, Spain; ^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), C/Valderrebollo 5, Madrid, Spain; ^dLaboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina

The survival signals are essential for the establishment of the mesenchymal phenotype and maintenance of the cancer stem cell.

Correspondence: Francisco Wandosell, Ph.D., Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” CSIC-UAM & CIBERNED, C/Nicolás Cabrera n° 1, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. Telephone: 34-91-1964561; Fax: 34-91-1964420; e-mail: fwandosell@cbm.uam.es

Received May 16, 2014; accepted for publication October 11, 2014; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* November 19, 2014.

© AlphaMed Press
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.1904>

ABSTRACT

Many solid tumors contain a subpopulation of cells with stem characteristics and these are known as cancer stem cells (CSCs) or tumor-initiating cells (TICs). These cells drive tumor growth and appear to be regulated by molecular pathway different from other cells in the tumor bulk. Here, we set out to determine whether elements of the PI3K-AKT pathway are necessary to maintain the CSC-like phenotype in breast tumor cells and for these cells to survive, bearing in mind that the identification of such elements is likely to be relevant to define future therapeutic targets. Our results demonstrate a close relationship between the maintenance of the CSC-like phenotype and the survival of these TICs. Inhibiting PI3K activity, or eliminating AKT activity, mostly that of the AKT1 isoform, produces a clear drop in TICs survival, and a reduction in the generation and growth of CD44^{High}/CD24^{Low} mammospheres. Surprisingly, the apoptosis of these TICs that is triggered by AKT1 deficiency is also associated with a loss of the stem cell/mesenchymal phenotype and a recovery of epithelial-like markers. Finally, we define downstream effectors that are responsible for controlling the CSC-phenotype, such as FoxO-Bim, and the death of these cells in the absence of AKT1. In summary, these data closely link the maintenance of the stem cell-like phenotype and the survival of these cells to the AKT-FoxO-Bim pathway. *STEM CELLS* 2015;33:646–660

INTRODUCTION

There is now considerable evidence that tumors contain heterogeneous clonal subpopulations of cells, one of which is the cancer stem cell (CSC) or tumor-initiating cells (TICs) population that retains a stem cell-like phenotype. CSC or TICs were initially reported in human acute myeloid leukaemia's [1]; however, they have since been identified in a wide variety of solid tumors [2–6]. TICs are thought to be responsible for the growth, progression, recurrence, and metastasis of tumors [7], and once tumorigenesis has been initiated, TICs may self-renew and spawn differentiated cell derivatives. TICs exhibit substantial growth differences in vitro when compared to conventional adherent cells [8], and one of the most striking aspects of TICs is their tremendous plasticity, a feature that directly drives tumor development and metastasis [7, 9, 10].

It is generally accepted that tumor growth and metastasis are tightly linked to the capacity to suppress apoptosis and/or to enhance survival. The PI3K-AKT pathway is considered to be one of the most relevant pathways involved in these processes, and that is activated in normal

and cancer cells. The involvement of the PI3K-AKT pathway in the development and progression of cancer has been studied extensively [11], establishing AKT1 as an oncogene [12]. Some elements in this pathway (i.e., PI3K, PTEN, or AKT) may control tumor cell proliferation [13, 14] and/or the maintenance of the tumor phenotype [13]. Indeed, AKT is frequently activated in human cancers (reviewed in [15]) and its hyper-activation (directly by over-expression or mutation, or indirectly through alterations to PTEN) offers protection against apoptosis and at least in part promotes “uncontrolled cell-cycle progression” [16], two major prerequisites for cancer susceptibility [17].

Although hyper-activation of the PI3K-AKT pathway is involved in the progression of the majority of tumor types [18], the role of each AKT isoform in tumor development remains unclear [19]. In different models of breast cancer, AKT1 appears to play a fundamental role in the propagation of such tumors [20–23]. Moreover, while AKT1 is involved in normal breast involution, and its ablation promotes apoptosis and accelerates this process, the ablation of AKT2 inhibits apoptosis and delays involution [22].

Migration is one of the key reasons of cancer dissemination. Aberrant motility can also facilitate cancer progression, and growth factors and chemoattractants can stimulate migration, growth, survival, and metabolic events that influence tumor progression. An increase in mobility and a loss of polarity is a general characteristic of many tumors, and it may determine their aggressiveness and metastatic potential. Thus, hyper-activation of some elements downstream of AKT, such as Rac, alone or in combination with PAK and/or some PKC isoforms, may exacerbate the migratory/invasive capacity of tumor cells [24].

In this study, we set out to establish whether elements of the PI3K-AKT pathway might be responsible for the establishment of the TICs phenotype and its maintenance. Using serum-free defined media, we enriched in stem/progenitor tumor cells *in vitro*. In these cell culture conditions, we determined that breast lineage contained a population of cells with a stem-like phenotype, characterized as CD44^{High}/CD24^{Low} cells, were very sensitive to the blockade of PI3K activity. More importantly, we found that AKT1 plays an important dual role in the maintenance of the stem cell-like characteristics or the mesenchymal phenotype of these cells, and in survival signaling. Furthermore, we show that the lack of AKT1 induces apoptotic cell death executed through the FoxO-Bim axis. In summary, these data link the adoption of a stem-like phenotype and the maintenance of TICs survival to the AKT-FoxO-Bim pathway.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The MDA-MB-231 and MCF-7-Ras cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 0.1% penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 mg/ml). The MCF-7-Ras cells were obtained from the stable infection of MCF-7 using the lentivirus Lenti-Ras-V12.

"Mammospheres" cultures were performed as described in [25], using DMEM/F-12 with FGF-2 (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml, Peprotech, USA), heparin, B27 supplement (without Vitamin A), 0.1% penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 mg/ml), except that the culture medium contained 1% methyl-cellulose to prevent cell aggregation. The mammospheres were cultured for 4–7 days and then, mammospheres with a diameter >75 µm were counted. For serial passages, mammospheres were harvested using 70 µm cell strainers after 7 days in culture. The mammospheres were dissociated to single cells with trypsin, and 1,000 dissociated cells were plated in a 24-well plate and cultured for 7 days. For TGFβ1 treatment, the cells were cultured in DMEM/F-12 media (1:1) supplemented with insulin, epidermal growth factor (EGF), hydrocortisone, and 5% calf serum, and treated with 2.5 ng/ml of TGFβ1 for 12 days. Cultured cells were photographed on day 2. MCF-10A cells were grown in DMEM/F-12 media (1:1) supplemented with 10 mg/ml insulin (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 ng/ml EGF (Tocris, Bristol, U.K.), 0.5 mg/ml hydrocortisone (Calbiochem, San Diego, CA), Cholera Toxin 100 ng/ml (Sigma, St. Louis, MO), and 5% horse serum (GIBCO/Invitrogen) at 37°C, 7% CO₂, and 97% relative humidity [26].

Limiting dilution assay was performed essentially as described in [27]. Cells populations, after shcontrol and

shAKT1 lentivirus infection, were separated by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The different populations CD44^{High}/CD24^{Low} and CD24^{High}/CD44^{Low} were seeded at different dilutions and growth, and the final amount of cells quantified at 7 days. The final data and the statistical significances were calculated using the Extreme Limiting Dilution Analysis software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/limdil/index.html>) [27].

Antibodies and Western Blotting

Cells were lysed in the presence of 50 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.5% SDS, and 1% Triton X-100. Thirty micrograms of total protein from each sample was resolved on a 4%–12% Bis-Tris Gel with Running Buffer and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were then probed with antibodies against proteins, such as Actin and β-Tubulin (Sigma, St. Louis, MO), E-cadherin, BIM, β-catenin (BD Transduction, San Diego, CA), vimentin V9 (NeoMarkers, Fremont, CA), pSer253-FoxO3, pSer9/21α/βGSK3, pSer473, pThr308-AKT, AKT1, AKT2, total AKT, pSer139-Histone H2AX, cleaved caspase 3 (casp3 Act), pThr202/Tyr204-ERK, Cyclin D1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), α/βGSK3 (Invitrogen), survivin (sc10811, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), and MnSOD (Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada). The secondary antibodies used in Western blots were a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgGs (DAKO, Glostrup, Denmark).

Immunofluorescence

The cells were attached on to poly(L-lysine) (0.0033%, Sigma, St. Louis, MO) and laminin (10 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO) coated glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde. They were then permeabilized for 10 minutes with 0.1% Triton X-100 in phosphate buffer saline (PBS), and blocked for 20 minutes with 0.1% Triton X-100 and 1% FBS in PBS. The cells were incubated with the following antibodies overnight at 4°C: anti-Vimentin (1:100, NeoMarkers), anti-β-catenin (1:200, BD Transduction, San Diego, CA), anti-E-cadherin (1:200, BD Transduction, San Diego, CA), and anti-pSer473-AKT (1:100, Cell Signal). The coverslips were washed three times and incubated for 1 hour at RT with the appropriate secondary antibody: donkey anti-rabbit IgGs Alexa 488 (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA) or donkey anti-mouse IgGs Alexa 555 (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA). In all cases, the nuclei were counterstained with TO-PRO and visualized on abn Axiovert200 microscope (Zeiss).

Drugs and Inhibitors

The reagents used were: Doxorubicin, propidium iodide, puromycin (polybrene), hexadimethrine bromide, (MTT) 3-[4,5-dimethylthiazo-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide all of them obtained from Sigma, St. Louis, MO, LY290042 (20 µM), QVD-fmk (25 µM), SB415286 (25 µM), SB203580 (30 µM), and SP600125 (20 µM) were purchased from Tocris. Triciribine (Akt Inhibitor V) was purchased from Calbiochem, Bristol, U.K., used at 10 µM.

FACS Analysis

The anti-CD44 (clone G44-26), anti-CD24 (clone ML5), and EpCAM (clone VU-1D9) antibodies used for FACS analysis were obtained from BD Bioscience, San Diego, CA. The mammospheres were digested with 0.025% trypsin for 5 minutes at 37°C to dissociate them into single cells. The dissociated cells

were stained with antibodies against CD29 (Chemicon, Temecula, CA) or apoptosis markers (cells were stained with annexinV-FITC and 7-amino-actinomycin D [7-AAD]; BD Biosciences, San Diego, CA) according to the manufacturer's guidelines, and they were analyzed by flow cytometry (BD Biosciences, FACSCalibur). The MDA-MB-231 shcontrol and shAKT1 cells were sorted and for carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) cell proliferation measurements, the treated cells were incubated with 1 μ M CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 20 minutes at 37°C and analyzed by flow cytometry.

Lentiviral and Retroviral Vector Production and Infection

Pseudotyped lentivectors were produced using reagents and protocols from Didier Trono with the following modifications. The 293T cells were transiently cotransfected with 5 μ g of the corresponding lentivector plasmid, 5 μ g of the packaging plasmid pCMVdR8.74 (Addgene), and 2 μ g of the VSV-G envelope protein plasmid pMD2G (Addgene) using Lipofectamine Plus reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Lentivector shRNA control, AKT1, AKT2, and β -catenin were obtained commercially from Sigma-Aldrich (MISSION shRNA). The pLenti-RASV12 lentivector was a generous gift from Judith Campisi (Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA), and expresses a constitutively active isoform of RAS. The retroviral vectors used were pBabe-pur and pBabe-DNFoxO3, kindly provided by Clemens Schmitt (Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany) and the retrovectors were pMKO shRNA green fluorescent protein (GFP), shRNA Bim, and pMKO Bad obtained from Addgene. Retrovirus supernatant was prepared by transfection of phoenix-Ampho cells (Garry Nolan, Baxter Laboratory in Genetic Pharmacology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, 450 Serra Mall, Stanford, CA) with 5 μ g of each plasmid using Lipofectamine plus (Invitrogen). Cells were infected in the presence of polybrene (4 μ g/ml) and selected with puromycin (1 μ g/ml).

Soft Agar Assay

To evaluate the tumorigenic potential of the cells after the inhibition of PI3K by LY294002 (20 μ M), 2×10^4 viable cells per well were plated in soft agar in six-well plates. Briefly, the base layer was made by mixing equal volumes of sterile 1% agar, cooled to 40°C, and $2 \times$ proliferation medium, to obtain a final solution of 0.5% agar in $1 \times$ mammospheres culture. For the top layer, the agar was diluted to 0.7% in distilled water, cooled to 40°C and then mixed in equal proportions with $2 \times$ DMEM medium. The cells were immediately added to the mix to yield a final solution of 0.35% agar in $1 \times$ DMEM medium containing 10,000 cells per milliliter. The cells were grown for 10 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, and viable colonies were then stained with 1 ml/well of 600 μ g/ml MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma, St. Louis, MO), photographed, and counted using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Statistical Analysis

The Student's *t* test was used to compare the data from the groups. The differences are presented with their corresponding

statistical significance or *p* value (* denotes a *p*-value < .05), the probability that the observation occurred merely by chance under the null hypothesis.

RESULTS

The CSC-Like Phenotype and Survival Are Maintained by the PI3K-AKT Pathway

Using serum-free media, we enriched CSC in floating spherical colonies in vitro, naming these as mammospheres. To determine the role of PI3K-AKT in the TICs population, we used three widely studied breast cell lines, MDA-MB-231, MCF7-Ras, and MCF10A. Using both the MDA-MB-231 (Fig. 1A, 1B) and MCF7-Ras (Supporting Information Fig. S1A, S1B) cell lines, we were able to generate mammospheres in vitro, and their growths were sensitive to the PI3K inhibitor, LY294002. We found that LY294002 had a concentration-dependent effect on these CSC-markers, lowering the expression of the CD44^{High}/CD24^{Low} marker from 68.38% to 37.45% at the highest concentration assayed (Supporting Information Fig. S1C). However, the addition of LY294002 to MDA-MB-231 cells growing in FBS medium only reduced the total number of cells by 32.7% as opposed to the 85% reduction in mammospheres culture (Fig. 1B). Similar results were obtained with MCF7-Ras cells (Supporting Information Fig. S1A, S1B). As an internal control, we confirmed the inhibition of PI3K by demonstrating that elements downstream of AKT were sensitive to LY294002, such as pSer9/21-GSK3, β -catenin and cyclin D1 stability (Supporting Information Fig. S1D) as well as the cellular distribution of β -catenin (Supporting Information Fig. S1E).

We took MDA-MB-231 cells growing as mammospheres and subcultured them in soft agar, in the presence or absence of LY294002. The presence of LY294002 strongly reduced the capacity of MDA-MB-231 to form colonies in these conditions (332 ± 26 vs. 167 ± 23 colonies/plate; Fig. 1C).

It is generally accepted that TICs are more resistant to treatments aimed at combating tumors, or that they induce resistance after drug application. Our data showed that subtoxic concentrations of doxorubicin induced cell cycle arrest at the G2/M transition, with a small percentage of cells remaining at subG0/G1 (Fig. 1D, 1E). The presence of low doses of LY294002 clearly enhanced the sensitivity of these cells to cell-death induced by genotoxic stress ($23.07\% \pm 1.8\%$ vs. 5% of subG0/G1 in the presence or absence of LY294002, respectively; Fig. 1D). In addition, we analyzed whether LY294002 or doxorubicin alone, or a combination of both affected the viability of secondary spheres and stem-markers (CD44^{High}/CD24^{Low}). Our data showed that LY294002 or doxorubicin inhibited growth moderately but the combination of Ly+Doxo showed a significant impair in generating secondary spheres, increasing cell death, and with a concomitant drop in CD44^{High}/CD24^{Low} population (Fig. 1G–1F). In conjunction, these data strongly indicated that these breast tumor cells: (a) contain CSC-like cells; (b) expressed CSC markers; and (c) that their PI3K activity plays an important role in maintaining this CSC-like phenotype and their stem cell characteristics.

One of the most important proteins controlled by class I PI3K is AKT. To address whether AKT plays an essential role in mammospheres, generating and/or maintaining this stem-like phenotype, we knocked-down two AKT isoforms (nontarget

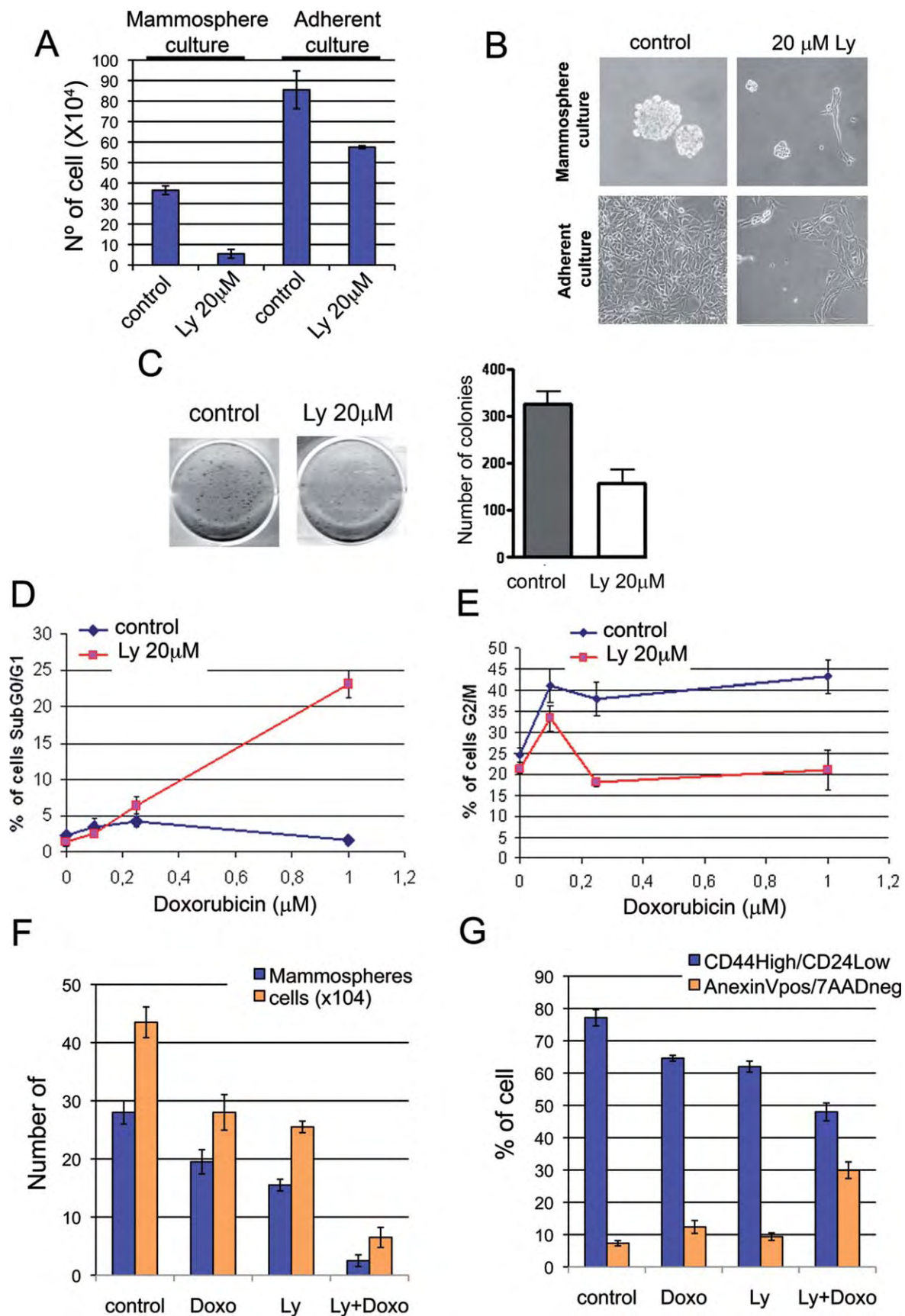


Figure 1.

control shRNA, or a shRNA directed against AKT1 or AKT2, see Materials and Methods). These transduced cells were then maintained in stem-like conditions or in FBS medium. We initially confirmed that the selected shRNAs for AKT1 and AKT2 specifically inhibited each isoform. Our data showed that the two specific shRNAs only affected the isoform against which they were directed, and in contrast, the control shRNA did not affect the expression of either of these isoforms, or that of the total AKT (Supporting Information Fig. S2A).

Having determined the specificity of these shRNAs, we used them to determine the effect of AKT knockdown on the expression of the CD44/CD24 markers. The knockdown of AKT1, and to a lesser extent that of AKT2, reduced the number of CD44^{High}/CD24^{Low} or CD44^{High}/CD24^{Low}/EpCAM^{Low} cells (Fig. 2A, 2B), and the effectiveness of these lentiviral constructs was further confirmed in Western blots (Supporting Information Fig. S2A). Silencing of either AKT1 or AKT2 drastically reduced the total amount of AKT, and it provoked a marked reduction of pSer9/21-GSK3 and of the total amount of β -catenin, when cells were grown in mammospheres culture after AKT-1 knockdown (Fig. 2C).

In addition, we analyze whether the inhibition of AKT (Triciribine 10 μ M) generated similar impairment generating secondary mammospheres than PI3K inhibitor (LY294002 20 μ M) or the knockdown of AKT1. As shown in the Supporting Information Figure S2B, S2C, the inhibition of AKT had a similar impact than LY294002 while the AKT1 knockdown of generated a stronger growth inhibition.

We have to conclude that LY294002 (Ly) or Triciribine (Tri) generates a partial inhibition of PI3K-AKT pathway (as inferred from Supporting Information Fig. S1D), whereas the knockdown of the AKT1 appears to be stronger inhibition as indicated some downstream elements (i.e., refer pSer 9/21-GSK3 in Fig. 2C).

To further assess these effects, we measured cell proliferation using an alternative CFSE staining approach (see Materials and Methods). Our data showed that only 23.34% of AKT1-KD cells underwent cell division compared with 56.05% in the case of AKT2-KD or 94.66% of the cells transduced with the shcontrol (Supporting Information Fig. S3A, S3B). In parallel, we examined cell cycle progression using FACS and a process that was defective in AKT1-KD cells, given the large proportion of subG0/G1 cells that accumulated when cultured as mammospheres (56.8% shAKT1 or 21.9% shAKT2 vs. 29.4% in shcontrol cells). However, when AKT1-KD cells were maintained in FBS-rich conditions, close to background levels of subG0/G1 cells were detected with an increase in the G2/M subpopulation alone (12% in shcontrol vs. 19.7% in AKT1-KD and 27% in AKT2-KD cells: Fig. 2C, 2D). In addition, the S-phase population also increased after silencing of either AKT isoform (Fig. 2E).

To further characterize the subG0/G1 population we studied markers of apoptosis, like active caspase 3, DNA damage, such as pSer139-H2AX, or cell cycle progression, such as survivin. Our data indicated that the knockdown of AKT1 reduced the amount of survivin and activated caspase 3, whereas knockdown of AKT2 generated a different profile that included an increase in survivin (Fig. 2F) and a distinct β -catenin response (Fig. 2B). To confirm that AKT1 silencing provoked caspase-dependent apoptosis, we added the pan-caspase inhibitor QVD-*fmk* to the mammospheres culture. Notably, in the presence of QVD-*fmk* the subG0/G1 population induced by shAKT1 returned to background levels (Fig. 2G).

AKT1 Silencing Provoked a Mesenchymal-Epithelial Transition

In many cases, the acquisition of the tumor phenotype involves an epithelial-mesenchymal transition (EMT) [28], a process that is often correlated with a switch in the expression of certain markers, such as CD44, Vimentin, N/E-cadherin, integrins, and so forth [7]. Thus, we set out to study how AKT silencing affected different TICs and EMT markers. Again, when AKT1 or AKT2 was silenced and the cells were maintained as mammospheres, AKT1-knockdown in both MDA-MB-231 (Fig. 3A) and MCF7-Ras (Fig. 3C) diminished the levels of β -catenin or Vimentin when compared with the controls. More surprisingly, the silencing of AKT1 generated a strong increase in E-cadherin expression in both cell types, coupled with the reduction in vimentin expression in MDA-MB-231 cells (Fig. 3A). This effect was barely detected in AKT2-KD cells (Fig. 3A, 3C). Indeed, immunofluorescence analysis corroborated the accumulation of E-cadherin in the surface of AKT1-KD cells in conjunction with the low levels of β -catenin and vimentin (Fig. 3B). Similarly, shAKT1 transduction resulted in the loss of the CD44^{High}/CD24^{Low} stem cell phenotype in MCF7-Ras cells (Fig. 3D).

In addition to these EMT markers, we also analyzed the expression of β 1 integrin (CD29), a protein that appears to be an important element for cell survival and the recycling of which may be controlled by AKT [29]. We found that MDA-MB-231 cells growing as mammospheres expressed a high level of CD29 (70% \pm 4%), although the knockdown of AKT1 or AKT2 significantly reduced this expression of CD29 (38% \pm 3% in AKT1-KD and 25% \pm 2% in AKT2-KD cells: Supporting Information Fig. S4A, S4B). Moreover, both shAKT1 and shAKT2 reduced the expression of integrin β 1. In conclusion, the silencing of AKT1 expression is paralleled by a switch

Figure 1. Involvement of the PI3K-AKT pathway in the maintenance of the stem-like profile of breast tumor-initiating cells and their resistance to chemotherapeutic agents. **(A, B):** MDA-MB-231 cells (5×10^4) were seeded onto 6 cm plates ($n = 3$) in different culture conditions, in the presence or absence of LY294002. The live cells were counted using trypan blue. The error bars represent the SD. In **(B)** representative phase-contrast brightfield images of **(A)**. Scale bars = 50 μ m. **(C):** Representative image of anchorage independent growth (soft agar) of the cells grown in the presence of LY294002 (20 μ M) for 7 days. The graph shows the means and SD of the number of colonies observed in three independent experiments. **(D, E):** Flow cytometry quantification of the subG0/G1 fraction through a cell cycle analysis of MDA-MB-231 cells maintained in the presence or absence of LY294002 (20 μ M), and when treated with different concentrations of doxorubicin. **(F):** Quantification of the generation of secondary mammospheres, and final number of MDA-MB-231 cells, in the absence (control) of any drug; or in presence of LY294002 (Ly 20 μ M), or doxorubicin (Doxo 1 μ M), or both compounds, for 7 days. **(G):** Flow cytometry quantification of the proportion of CD44^{High}/CD24^{Low} population and determination of the viability by AnnexinV/7-AAD staining in MDA-MB-231 cells maintained in the absence of any drug (control), or presence of LY294002 (Ly 20 μ M), or doxorubicin (Doxo 1 μ M), or both compounds for 7 days.

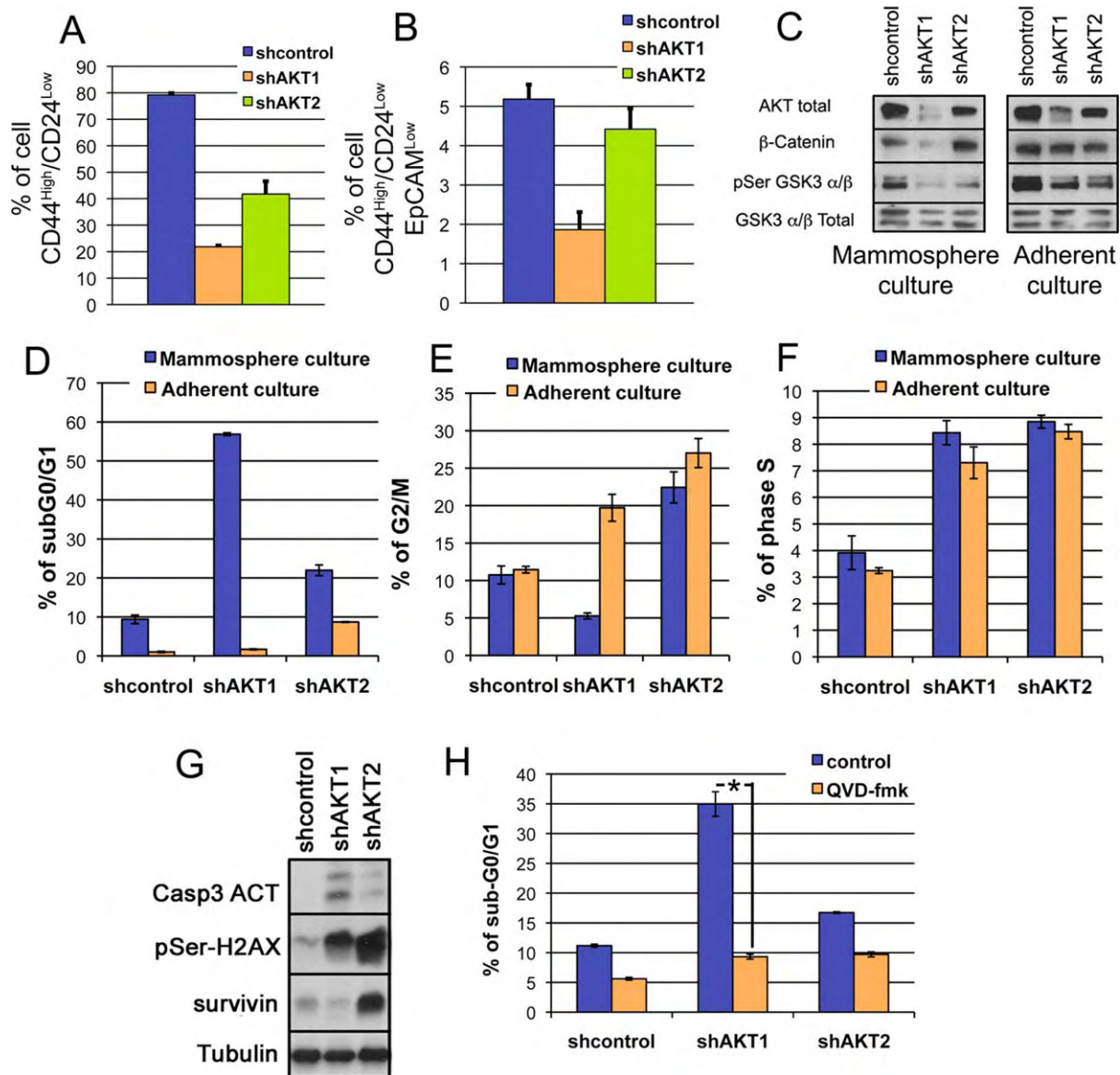


Figure 2. AKT1 is the main AKT isoform involved in the survival of tumor-initiating cells. **(A, B):** Flow cytometry quantification of the CD44^{High}/CD24^{Low} or CD44^{High}/CD24^{Low}/EpCAM^{Low} in MDA-MB-231 cells 7 days after AKT1 or AKT2 knockdown, or using a shRNA as an internal control. Graphs show the means and SD of three independent experiments. **(C):** In a similar experiment, the cells were maintained for 7 days as mammospheres or they were transferred for 48 hours to adherent culture conditions (Dulbecco's modified Eagle's medium + 10% fetal bovine serum). The Western blot shows the expression of AKT, β -catenin, α/β GSK3 phosphorylation, and total α/β GSK3. **(D–F):** Fluorescence-activated cell sorting analysis of the different phases of the cell cycle in MDA-MB-231 cells 7 days after AKT1-KD or AKT2-KD. Graphs show the percentage of cells in subG0/G1 (C), G2/M (D), or S phase (E) of the cells maintained as indicated in (B). Graphs show the means and SD of three independent experiments. **(G):** Western blots showing the activation of caspases induced by the knockdown of AKT1. In addition, proteins involved in the control of DNA damage or cell cycle progression were analyzed, such as pSer-H2AX and survivin, respectively. **(H):** Analysis of cell death as the proportion of MDA-MB-231 cells in sub G0/G1 phase of the cell cycle after AKT1-KD, in the presence or absence of the caspase inhibitor QVD-fmk (25 μ M) introduced after a 4-day treatment in stem-like conditions (data represent the mean and SD, *, $p < .01$).

in mesenchymal to epithelial markers and a loss of CD44^{High}/CD24^{Low} positive cells.

The Loss of the Stem Cell-Like Phenotype Triggered by AKT1 Knockdown Is Not Due to GSK3- β -Catenin Deregulation

Since we were interested in characterizing some of the elements downstream of AKT1 that may control its influence on survival and/or the maintenance of the CSC-like phenotype,

we assessed the participation of elements like GSK3, β -catenin, FoxO, or Bad in these events. Our initial data (Figs. 2B, 3A, 3C) suggested a correlation between the loss of stem-like markers and apoptosis when AKT1 activity is silenced, and the low level of GSK3 Ser9/21 phosphorylation. These data might suggest that the increase in GSK3 activity could provoke the subsequent phosphorylation and degradation of β -catenin.

Considering the role of GSK3 and β -catenin in stem cell self-renewal [13], we set out to determine whether GSK3 or

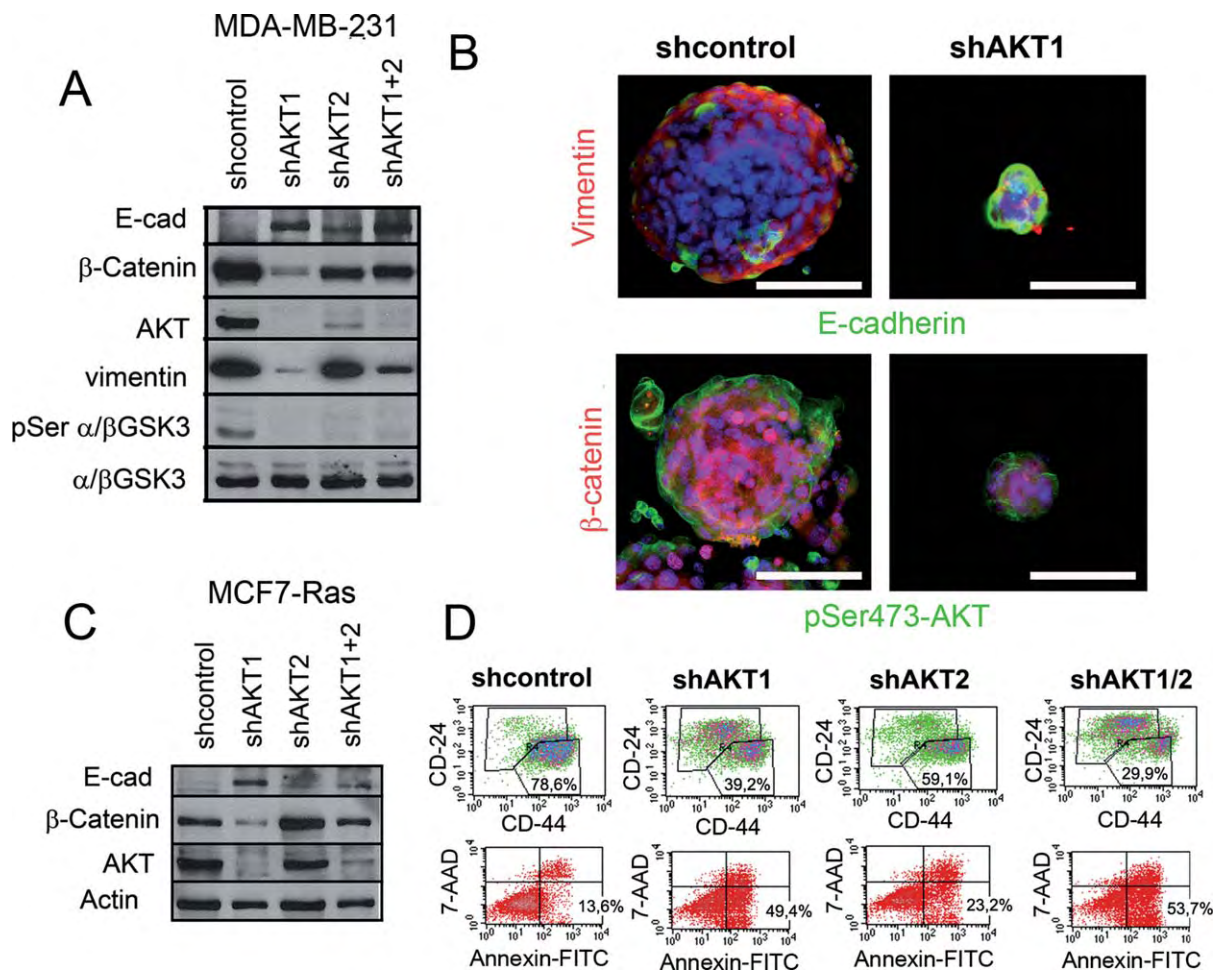


Figure 3. The maintenance of epithelial-mesenchymal transition markers is affected by AKT1 knockdown. **(A):** After knockdown of AKT1, AKT2, or AKT1/AKT2, and using a shRNA as internal control, MDA-MB-231 cells were maintained for 96 hours in mammosphere culture conditions. In Western blots, variations were evident in some of the epithelial and mesenchymal markers (anti-E-cadherin, β -catenin, and Vimentin), in AKT and pSer9/21- α/β GSK3, and in total α/β GSK3. **(B):** Representative confocal microscopy images of mammospheres of the MDA-MB-231 cells, detailed in (A), that received shcontrol or shAKT1. Staining for Vimentin, E-cadherin, β -catenin, and pSer473-AKT is shown and the nuclei were stained with TO-PRO3 in blue. Scale bars = 50 μ m. **(C):** Western blot analysis of the epithelial/mesenchymal markers (E-cadherin, β -catenin, and AKT) in MCF-7-Ras cells after 96 hours in mammosphere culture conditions and following AKT1, AKT2 or AKT1/AKT2 knockdown, or shRNA control. Actin was used as a loading control. **(D):** Flow cytometry analysis of the percentage of MCF-7-Ras cells that exhibit stem-like characteristics (CD44^{High}/CD24^{Low}), after AKT1, AKT2 or AKT1/AKT2 knockdown, or shRNA control. Abbreviation: 7-ADD, 7-amino-actinomycin D.

β -catenin may be at least partially responsible for the phenotype induced by AKT1-KD in our TICs. Accordingly, MDA-MB-231 cells were transduced with lentivirus containing either shAKT1 or a nontargeted control shRNA, and we subsequently inhibited GSK3, p38MAPK, and JNK. As an internal control we inhibited caspases with QVD-*fmk*. When, we assessed apoptosis using an Annexin-V assay and the CSC-phenotype according to the number of cells of a CD44^{High}/CD24^{Low} phenotype, only the addition of the caspase inhibitor QVD-*fmk* prevented cell death in the AKT1-KD cells ($25\% \pm 1.44\%$ vs. $39.06\% \pm 3\%$ in the presence or absence of the inhibitor, respectively), as corroborated in Western blots of these cells (Fig. 4A–4C). Similarly, a GSK3 inhibitor did not prevent the loss of the CD44^{High}/CD24^{Low} phenotype in AKT1-KD cells. Again, only the addition of the QVD-*fmk* caspase inhibitor significantly recovered the level of CD44^{High}/CD24^{Low} in AKT1-KD cells ($61.43\% \pm 1.59\%$ vs. $38\% \pm 2.28\%$ in the presence or absence of the inhibitor: Fig. 4B).

Surprisingly, all these data demonstrated a correlation between the loss of the CD44^{High}/CD24^{Low} stem cell phenotype and AKT1-dependent apoptosis. To demonstrate this correlation more directly, we FACS purified CD44^{High}/CD24^{Low} (stem cell-like tumor cells) and CD24^{High}/CD44^{Low} (nonstem cell tumor cells) after shcontrol and shAKT1 lentivirus infection (Fig. 4D). These cell populations were analyzed in Western blots, in which the nonstem cell CD24^{High}/CD44^{Low} population of AKT1-KD cells were seen to express the highest levels of E-cadherin and active caspase 3, coupled to a severe reduction in Vimentin. Accordingly, these changes were associated with the loss of the stem cell-like phenotype and with cell death (Fig. 4E). This strongly suggests that the elimination AKT1 in these TICs cells triggered apoptosis, the loss of the mesenchymal-like phenotype, and the recovery of epithelial markers in a fairly coordinated manner. Additionally, these populations were separated by FACS (CD44^{High}/CD24^{Low} and CD24^{High}/CD44^{Low}) and percentage of apoptosis determined

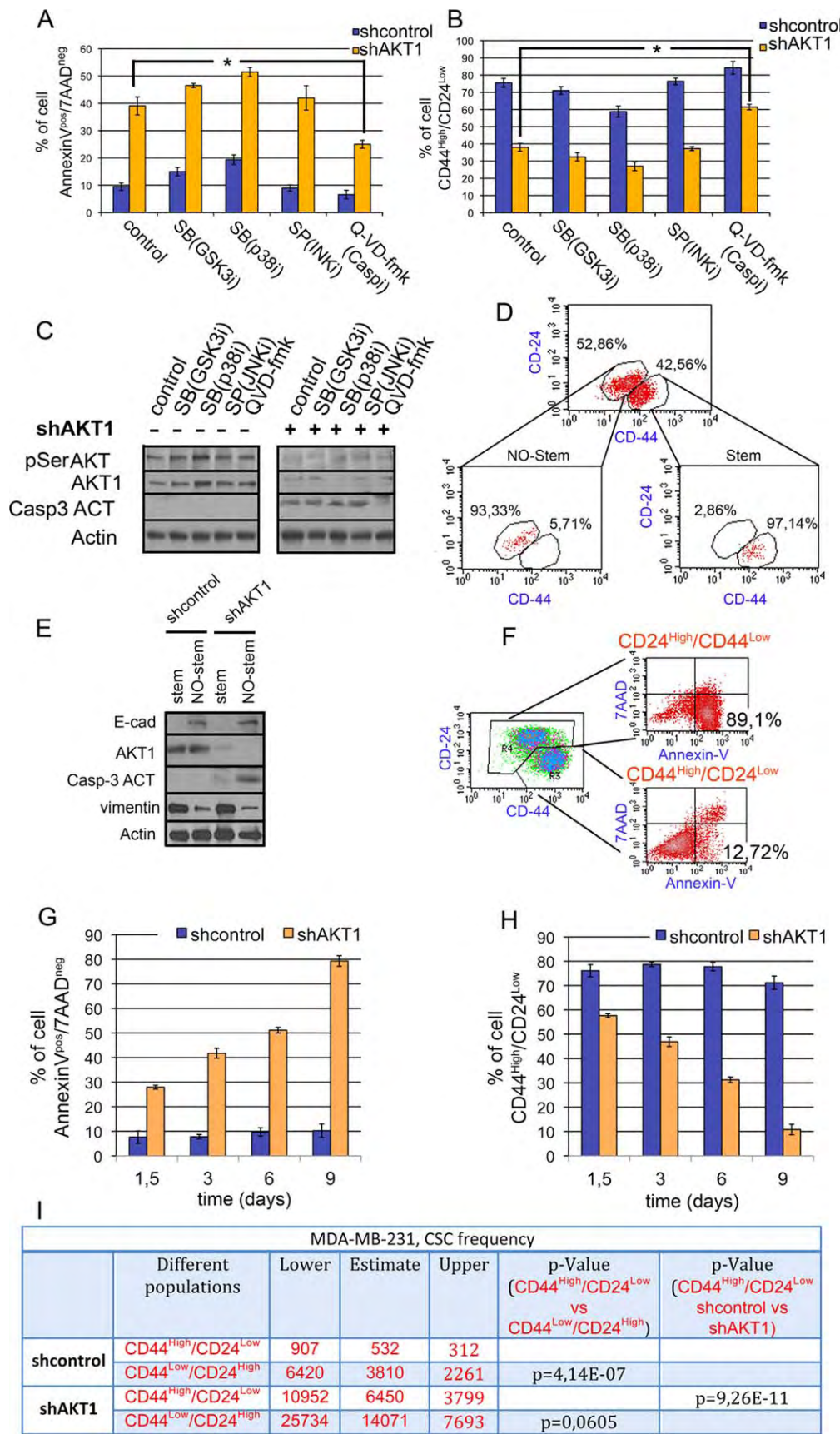


Figure 4.

using Annexin-V/7-AAD. Our data indicated that the majority of CD24^{High}/CD44^{Low} population undergoes cell death (Fig. 4F). To establish a correlation between the loss of CD44^{High}/CD24^{Low} population and the induction of apoptosis, we performed a time course (Fig. 4G, 4H), where it can be seen that the loss of phenotype CD44^{High}/CD24^{Low}, induced in AKT1-KD cells, correlated with the induction of cell death (Annexin-V/7-AAD).

Complementary to this information, we performed a limiting dilution analysis, as described in Materials and Methods, to test the capacity of both populations generating secondary mammospheres. Our data showed that CD44^{High}/CD24^{Low} cells were significantly enriched for CSC frequency compared to their CD24^{High}/CD44^{Low} counterparts (approximately eightfold, Fig. 4I) in the situation of no interference of AKT1 (shcontrol). However, in AKT1-KD cells, both populations showed clear impairment in growth when compared with shcontrol cells, with no statistical differences between CD44^{High}/CD24^{Low} and CD24^{High}/CD44^{Low} (Fig. 4I). These data demonstrate that AKT1 is a major key controlling intrinsic tumor-initiating and growth potential.

The second target analyzed was β -catenin, the loss of which in MDA-MB-231 cells suggested that β -catenin may act as a self-renewal element in these tumor cells. Thus, we inhibited the expression of β -catenin in MDA-MB-231 cells using a specific shRNA. Our data showed that the reduction in β -catenin (Fig. 5A) did not modify the level of apoptosis measured by either sub-G0/G1 or Annexin-V (Fig. 5A–5C). Rather, the loss of β -catenin inhibited the proliferation of these cells, as witnessed by the accumulation of cells in G0/G1 and their failure to enter S phase and G2/M (Fig. 5D–5F).

FoxO3 May Regulate Survival and CSC Markers Through Bim

Of all the AKT substrates, FoxO represents a group of proteins widely implicated in survival and apoptosis in many different cell systems (for review see [30]). Indeed, in our CSC-like blocking the expression of AKT1 decreased pSer473phosphorylation of AKT and could affect the activity of FoxO (Fig. 4C). In order to identify the precise role of this protein in the final phenotype evident when AKT1 is eliminated, we expressed a dominant-negative version of FoxO3a (DNFoxO3). We first generated MDA-MB-231-AKT1-KD cells, maintained them in mammospheres culture and then infected them with the pBabe-empty or pBabe-DNFoxO3. We then determined the proportion of CD44^{High}/CD24^{Low} cells and apoptosis 7 days

after infection, with DNFoxO3, the proportion of CD44^{High}/CD24^{Low} cells recovered substantially in the absence of AKT1 (pBabe-empty 45.05% vs. pBabe-DNFoxO3, 63.34%; Fig. 6A, 6B). This effect was paralleled by the modification of cell death, as indicated by the Annexin-V assay, the expression of pBabe-FoxO3-DN reducing the proportion of Annexin-positive cells by a similar ratio (pBabe-empty 50.15% vs. pBabe-DNFoxO3 35.82%; Fig. 6B).

The loss of pSer253-FoxO3 that was induced by AKT1 knockdown, was correlated with the increase in other proteins, such as MnSOD or Bim (Fig. 6C), while the expression of DNFoxO3 almost re-established basal conditions. All these data suggest that FoxO3 is responsible, at least in part, for the maintenance of cell viability and of the stem-like phenotype.

To confirm that AKT1 controls the Bim response, at least in some tumor cells, we again used the human mammary epithelial MCF-10A cell line. MCF-10A cells were infected with a Ras-V12 mutant lentiviral vector or with a lentivirus containing GFP alone as a control, and they were then transduced with shRNA control, shAKT1, or shAKT2. In Western blots of these cells, the reduction of AKT1 triggered an important increase in Bim expression (Fig. 6D) with a parallel increase of E-cadherin, as demonstrated in MDA-MB-231-AKT1-KD cells. In parallel, we determined that the modest but significant increase of the mammosphere formation induced by Ras-V12 expression was severely reduced by AKT1 knockdown (Fig. 6E).

The Impair of the Bim-Mediated Cell Death Allows the Transition to Mesenchymal Phenotype

To identify whether Bim lies downstream of this effect, we knockdown Bim and Bad in AKT1-KD cells, the latter representing an alternative AKT substrate. In fact it is well known that Bim may promote cell death [31] and thus, we initially tried to identify whether the reduction of Bim may have any noticeable effect on human mammary epithelial MCF-10A cells. The morphology of Bim knockdown cells was slightly modified in adherent cultures, whereas the reduction of Bim expression enhanced mammosphere formation in suspension. By contrast, no significant differences were evident in Bad-knockdown cells (Fig. 7A, 7B). In Western blots, the reduction in Bim was paralleled, with an important reduction in E-Cadherin expression that was most evident in mammosphere culture extracts (Fig. 7C).

Finally, to confirm the role of Bim we used MDA-MB-231 AKT1-KD cells to demonstrate that the reduction of Bim

Figure 4. The inhibition of GSK3 activity did not restore the phenotype or cell viability of tumor-initiating cells in MDA-MB-231 cells. (A, B): The involvement of several kinases in the loss of the stem cell profile and viability triggered by AKT1-KD was analyzed. (A): The proportion of cells infected with the shcontrol or shAKT1 lentiviral vector that exhibit CD44^{High}/CD24^{Low} staining when maintained in the presence of SB(GSK-3 inhibitor, 25 μ M), SB(MAPK p38 inhibitor, 25 μ M), SP(JNK inhibitor, 20 μ M), QVD-fmk (inhibitor of pan-caspases, 25 μ M). (B): Similar experiment as in (A), showing 7-AAD negative cells stained for AnnexinV. Graphs show the means and SDs of three independent experiments. *, $p < 0.01$ (C): Western blot of extracts from the cells described in (A) to show caspase 3 activation, pSerAKT, AKT1, and Actin was used as a control for loading. (D, E): Fluorescence-activated cell sorting (FACS) separation of CD44^{Low}/CD24^{High} cells from CD44^{High}/CD24^{Low} cells after either AKT1-KD or shcontrol infection. The lower graphs show the purity of each fraction. Western blot of the FACS purified fractions of CD44^{Low}/CD24^{High} and CD44^{High}/CD24^{Low} cells analyzing the expression of E-cadherin, AKT1, caspase 3 active, vimentin, and Actin in (E). (F): The MDA-MB-231 sorting by FACS in part (A) was then stained with AnnexinV/7-AAD to analyze cell death. (G, H): Flow cytometry quantification of the proportion of CD44^{High}/CD24^{Low} and to determine of the viability by AnnexinV/7-AAD staining of MDA-MB-231 cells at different days postinfection of shcontrol or shAKT1 lentivirus. (I): Limiting dilution analysis of MDA-MB-231 FACS separation of CD44^{Low}/CD24^{High} cells from CD44^{High}/CD24^{Low} cells, after either AKT1-KD or shcontrol infection. Mammospheres generation was quantified at 7 days and cancer stem cell frequency was determined by ELDA. Abbreviation: 7-ADD, 7-amino-actinomycin D.

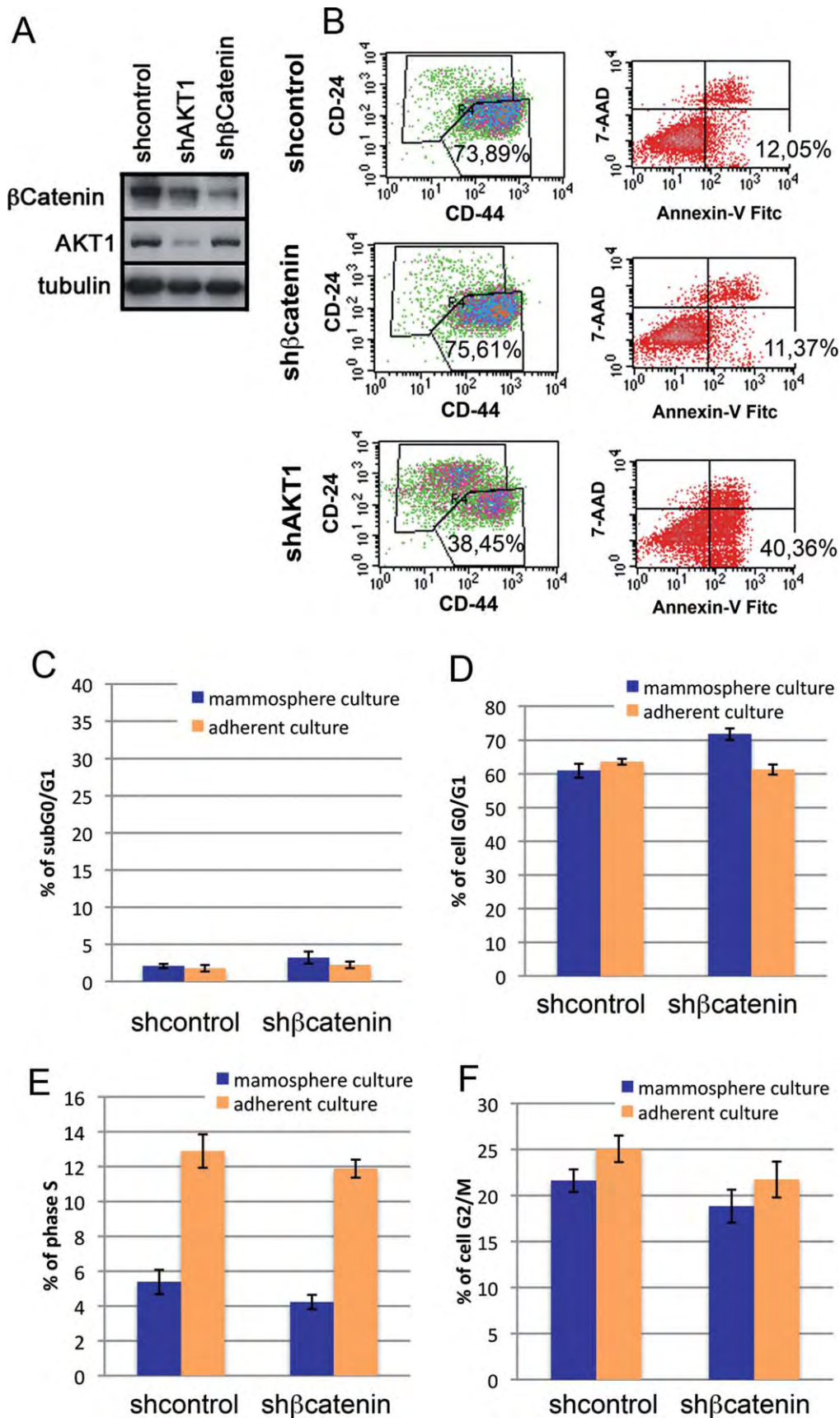


Figure 5. β -Catenin controls tumor-initiating cells (TICs) proliferation but not their survival. MDA-MB-231 cells were transfected with shcontrol, shAKT1, or sh β -catenin lentiviral vectors and they were grown as TICs for 7 days (mammospheres), or for 6 days supplemented with fetal bovine serum medium on the last day (adherent conditions: C–F). (A, B): The efficiency of the each knockdown is shown. (B): In parallel experiments, we determined the proportion of CD44^{high}/CD24^{low} cells and their viability, demonstrating that the reduction of β -catenin did not modify the CSC population or their viability, whereas AKT1 silencing did, as indicated previously. (C–F): We analyzed the cell cycle by flow cytometry to determine the proportion of cells in subG0/G1 (C), G2/M (D), or S phase (E). Note that the reduction/elimination of β -catenin did not produce any significant difference in these mitotic subpopulations when compared with the shcontrol cells. Abbreviation: 7-ADD, 7-amino-actinomycin D.

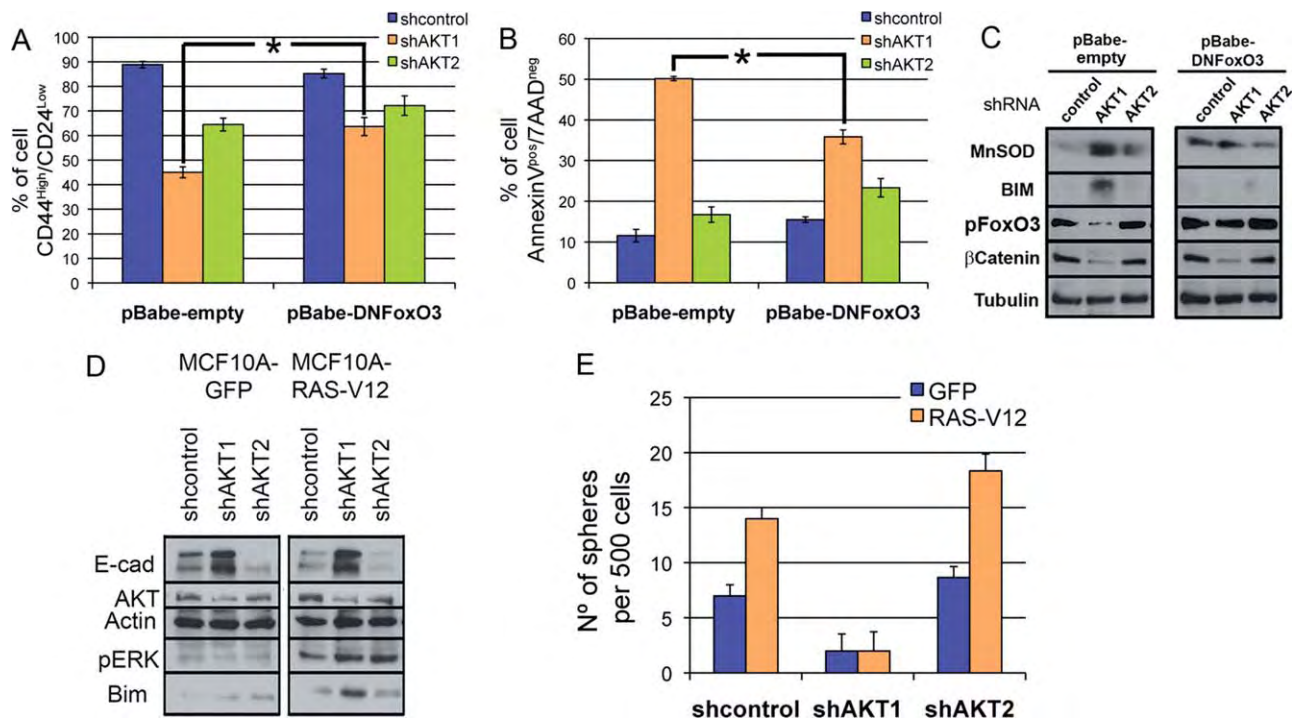


Figure 6. FoxO3 is a regulatory element downstream of AKT1 that controls the phenotype and viability of TICs. **(A, B):** MDA-MB-231 cells were grown in stem cell culture conditions after silencing AKT1 or AKT2, or shcontrol infection, and they were then transduced with a dominant negative version of DNFoxO3 or the empty vector as a control. In parallel cultures, we determined the proportion of CD44^{High}/CD24^{Low} cells by fluorescence-activated cell sorting (A), and of cell death by AnnexinV/7-AAD staining (B), (data represent the mean and SD, **p* < 0.01). **(C):** In Western blots, the over-expression of MnSOD and Bim, as well as the reduction of pSer253-FoxO3, is restored by the DNFoxO3 expression in AKT1-KD cells. Tubulin was used as a control of loading. **(D):** MCF-10A cells were infected with a GFP or mutant Ras-V12 lentiviral vector and they were then transduced with a lentiviral vector containing shcontrol, shAKT1, or shAKT2. The expression of E-cadherin, pERK, Bim, and AKT was analyzed in Western blots. Actin was used as a control of loading. **(E):** MCF-10A cells, expressing the Ras-V12 or control GFP vectors, were grown as spheres in mammospheres culture. Abbreviations: 7-ADD, 7-amino-actinomycin D; GFP, green fluorescent protein.

increased cell viability and simultaneously, recovered the CD44^{High}/CD24^{Low} phenotype. By contrast, the reduction of Bad not only failed to improve this situation but it deteriorated it further (Fig. 7E, 7F). All these data indicated that the reduction of Bim re-established the stem cell-like phenotype impoverished by AKT1-KD, a suggestion that was consistent with the capacity to form secondary mammospheres (Fig. 7D).

DISCUSSION

It is currently believed that a subset of cells exist in many tumors with stem cell-like properties, denominated CSC or TICs. Their abundance varying among tumors but TICs are thought to be responsible for the initiation, recurrence, and metastases of a tumor [7, 28]. Our present results demonstrate that there is a close relationship between the maintenance of the CSC-like phenotype and survival signals, and that these processes are controlled by the PI3K-AKT pathway or elements therein. When we block PI3K activity using the inhibitor LY294002, or we inhibit AKT or knockdown AKT1, we observe a clear fall in TICs survival as well as a reduction in the TICs population size (measured as CD44^{High}/CD24^{Low} population), which hinders the generation and growth of mammospheres. In our CSC model, the presence of a low concentration of doxorubicin did not provoke evident cell death whereas the subsequent addition of LY294002 finally did.

Surprisingly our data showed that the loss of cell viability provoked a modification of the CSC phenotype, whereby cells expressing stem/mesenchymal characteristics like CD44^{High}/CD24^{Low}, high Vimentin, low E-cadherin, were replaced by those with an epithelial-like phenotype (low Vimentin, high E-cadherin). We reach similar conclusion when we consider CD44/CD24/EpCAM markers, populations previously defined in breast cancer, such as CD44^{High}/CD24^{Low}/EpCAM^{Low} "stem-like"; CD44^{High}/CD24^{Low}/EpCAM^{Neg} "basal"; and CD44^{High}/CD24^{Low}/EpCAM^{High} "luminal" [7, 32]; while AKT reduction produced an acute decrease of the CD44^{High}/CD24^{Low}/EpCAM^{Low} population.

Interestingly, we observed that when AKT activity was interfered with or reduced, CSC appeared to undergo a MET transition before they die. Conversely, when this activity was enhanced, not only was CSC survival and growth restored/maintained, but so were the markers of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). This strongly suggests that some AKT-dependent elements are essential in the maintenance of this CSC phenotype.

We next tried to identify whether either AKT1 or AKT2 contributes to a specific aspect of the CSC-like phenotype. Some earlier data showed that in a model of mice expressing the ErbB2 oncogene targeted to the mammary epithelium (MMTV-ErbB2-8142), AKT1 fulfilled a major role in tumor progression in vivo, possibly controlling polarity and growth [21]. Our data show a prominent role of AKT1 and to a lesser extent of AKT2 isoform in such processes.

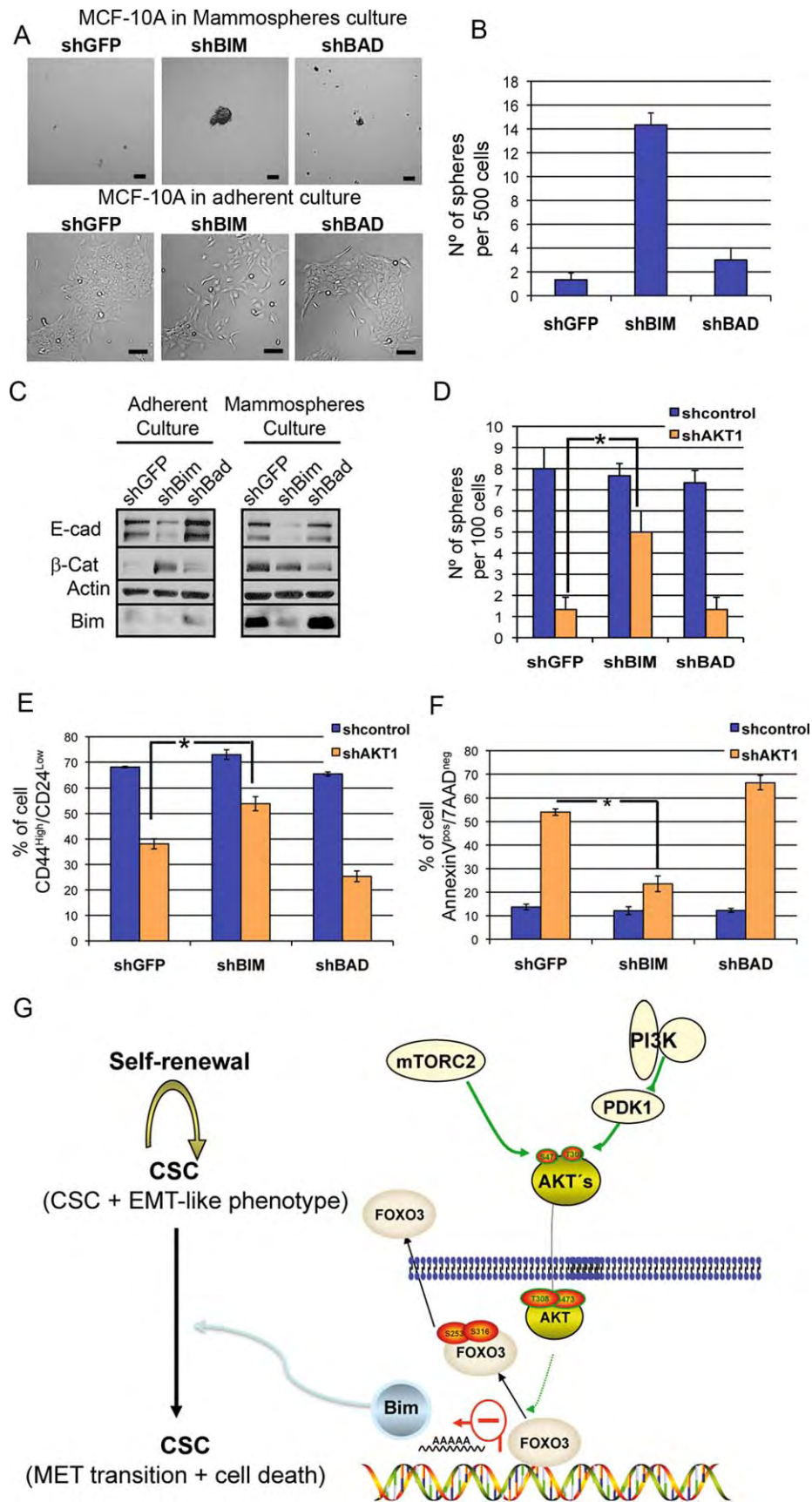


Figure 7.

AKT1 provokes a loss of tumor cells with a CD44^{High}/CD24^{Low} phenotype and a reduction in their capacity to grow as mammospheres in suspension. Hence, we speculate that AKT1 controls survival signals required to establish the CSC-like phenotype. As mentioned, the reduction in AKT1 activity stimulates the MET in both cell models, MDA-MB-231 and MCF7-Ras, and in both cases this was linked to the induction of cell death. Indeed, we subsequently demonstrated that inhibiting apoptosis with the caspase inhibitor QVD-*fmk* not only rescues cell death induced by AKT1 deficiency but also it prevents the loss of the CD44^{High}/CD24^{Low} marker. The purification of both populations in function of the levels of CD44/CD24, and the subsequent analysis by limiting dilution assay, more clearly corroborates this data. In conjunction, it would appear that the expression of the CD44^{High}/CD24^{Low} and other mesenchymal markers in CSC-like cells is tightly linked to the survival of TICs and that this may be controlled by AKT.

Currently there is evidence of a differential effect among AKT isoforms [33]. Several studies have attempted to define the involvement of AKT isoforms in models of tumorigenesis, concluding that AKT1 plays a key role in tumors that lack PTEN function [20]. There is evidence that AKT isoforms can exert compensatory effects, although in our models the impairment of AKT1 or AKT2 does not produce identical biochemical profiles, as indicated by the effect on important proteins, such as survivin or β -catenin.

We tried to identify the elements located downstream of AKT1 that may control survival and maintenance of CSC-markers, not a trivial task considering the plethora of AKT substrates [11]. We focused simply on elements regulated by AKT-phosphorylation, and that are implicated in survival and/or stem-cell renewal. Thus, our first candidates were GSK3 and β -catenin, a pair of proteins widely implicated in cell division and stem self-renewal [13]. We observed a decrease in GSK3 phosphorylation due to the downregulation of AKT1 and subsequently, a decrease in the level of β -catenin; these data strongly suggested an increase in GSK3 activity. However, the subsequent inhibition of GSK3, or the over-expression of β -catenin (either wild-type or the transcriptionally active S33Y mutant), did not recover the phenotype or the expression of CSC markers (data not shown). In addition, the downregulation of β -catenin failed to replicate the phenotype of AKT1-KD. As such, we conclude that neither of these elements are implicated in the CSC-AKT1 mediated phenotype.

We next considered other AKT substrates implicated in the control of apoptosis and cell cycle regulation, the FoxO proteins [30, 34, 35]. In our experimental model, the downregulation of AKT1 modified the phosphorylation of FoxO3

and enhanced the expression of Bim, a downstream element regulated by FoxO. Hence, the execution of AKT-dependent death may be orchestrated through a FoxO3-Bim-dependent pathway. In fact, Bim has been implicated in apoptosis induced by a lack of adhesion, called “anoikis,” which is very relevant to breast cancer development [31, 36].

These data are reinforced by the fact that when we used epithelial-like cells, such as MCF-10A, and we transform them with Ras-V12, the downregulation of AKT1 reproduces almost all the steps that were described for MDA-MB-231 cells. Surprisingly, in both cell type, the apoptosis triggered by AKT1-KD is preceded by a MET transition, with some of the mesenchymal markers disappearing and being replaced by epithelial markers. It is tantalizing to propose that this EMT to MET conversion that is mediated by AKT downregulation is a prerequisite to execute cell death in our CSC-like model. We also found that the over-expression of either DNFoxO3 or the downregulation of Bim in CSC prevented AKT1-dependent cell death, again associated with the recovery of CSC-markers and the capacity to grow as mammospheres.

All these data lead us to hypothesize that the pathway controlled by AKT1 through FoxO and Bim coordinates the control of CSC survival, as well as the expression of CSC-like markers and the growth capacity of CSC as mammospheres (refer scheme in Fig. 7G). Several studies have shown a relationship between increased survival signals and the ability to increase growth of resistant phenotypes that show greater invasiveness and growth [37, 38]. So, we propose that increasing survival can promote the plasticity required to generate an easy epithelial to mesenchymal or mesenchymal to epithelial transition, favoring the colonization of other tissues [10]. The EMT program not only favors cancer cell spreading but it also confers the self-renewal capacity that is crucial for clonal expansion and dissemination. Here, we demonstrate that the elimination of AKT compromises survival and self-renewal, provoking the MET transition prior to cell death.

CONCLUSIONS

In this work, we tried to determine whether the elements of the PI3K-AKT pathway are necessary to maintain the CSC-like phenotype in TICs as well as for their survival. Our results demonstrate that inhibiting PI3K activity, or eliminating AKT1, produces a clear drop in breast carcinoma-TICs growth and survival. Moreover, cell death triggered by AKT deficiency is also associated with a loss of the stem cell/mesenchymal phenotype and the recovery of epithelial-like markers. We have

Figure 7. Bim but not Bad is a regulatory element downstream of AKT1 that controls the tumor-initiating cells (TICs) phenotype and viability. **(A):** MCF-10A cells grow poorly as mammospheres. We transduced MCF-10A with a retroviral vector containing shGFP, shBim, or shBAD, and these cells were maintained in mammospheres culture for 7 days or in fetal bovine serum medium (adherent culture). Scale bars = 50 μ m. **(B):** Quantification of the generation of secondary spheres in experiment (A). **(C):** The presence of E-cadherin and β -catenin was assessed in cell extracts from parallel cultures in Western blots. **(D):** Quantification of the generation of secondary spheres in the MDA-MB-231 cells transduced with a retroviral vector encoding for shGFP, shBIM, or shBAD, and these cells were subsequently grown as mammospheres. **(E, F):** MDA-MB-231 was transduced with a retroviral vector encoding for shGFP, shBIM, or shBAD, and these cells were subsequently infected with a shcontrol or shAKT1 lentiviral vector. After 7 days, the cells were analyzed by fluorescence-activated cell sorting to determine the proportion of CD44^{High}/CD24^{Low} cells (E), and we determined their viability by AnnexinV/7-AAD staining (F) (data represent the mean and SD, *, $p < 0.01$). **(G):** Scheme depicting how the pathway regulated by PI3K-AKT operates and how downstream FoxO3-Bim contributes to the maintenance of self-renewal and the survival of breast tumor TICs. Abbreviations: CSC, cancer stem cell; EMT, epithelial-mesenchymal transition; GFP, green fluorescent protein; MET, mesenchymal-epithelial transition.

described that by interfering cell death proteins downstream PI3K-ATK pathway, such as Bim, we were able to increase the sphere formation capacity and to modify the epithelial phenotype toward mesenchymal. Our results, therefore, extend our understanding of the signaling PI3K-AKT, which can demonstrate the closely link between survival and self-renewal-CSCs and plasticity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Jose A. Garcia-Sanz, from Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC (Madrid, Spain), for his exceptional advice and supporting information about ELDA Assay. This work was supported by grants from CIBERNED (which was an initiative of the ISCIII). In addition, the I.M.A. Lab was supported by grants from Spanish Ministry of Science and Innovation, Plan Nacional DGCT (SAF2013-45937-R). F.W. was supported by the Plan Nacional DGCT (SAF2012-39148-C03-01) and EU-FP7-2009-CT222887, and by an Institutional grant from the "Fundación Areces." R.G. was supported by CIBERNED and by a Juan de la Cierva postdoctoral fellowship from Spanish Ministry of Science and Innovation. The funders

had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.G.: conception and design, provision of study material, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript; J.P.C. and M.E.: provision of study material, collection and/or assembly of data, and final approval of manuscript; I.M.A.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript; F.W.: conception and design, financial support, administrative support, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645–648.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983–3988.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946–10951.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030–1037.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106–110.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396–401.
- Shiptsin M, Campbell LL, Argani P et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007;11:259–273.
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 2006;9:391–403.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- Thompson EW, Haviv I. The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat Med* 2011;17:1048–1049.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–1274.
- Carpten JD, Faber AL, Horn C et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007;448:439–444.
- Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 2009;7:e1000121.
- Skeen JE, Bhaskar PT, Chen CC et al. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* 2006;10:269–280.
- Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 2007;12:487–502.
- Kandel ES, Skeen J, Majewski N et al. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2002;22:7831–7841.
- Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK et al. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev* 2008;22:436–448.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627–644.
- Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 2009;8:2502–2508.
- Chen ML, Xu PZ, Peng XD et al. The deficiency of Akt1 is sufficient to suppress tumor development in Pten+/- mice. *Genes Dev* 2006;20:1569–1574.
- Ju X, Katiyar S, Wang C et al. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7438–7443.
- Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP et al. Distinct roles of the three Akt isoforms in lactogenic differentiation and involution. *J Cell Physiol* 2008;217:468–477.
- Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP et al. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* 2007;67:167–177.
- Whale A, Hashim FN, Fram S et al. Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:849–864.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65:5506–5511.
- Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003;30:256–268.
- Hu Y, Smyth GK. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods* 2009;347:70–78.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–715.
- Li J, Ballif BA, Powelka AM et al. Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration. *Dev Cell* 2005;9:663–673.
- Tothova Z, Gilliland DG. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: Insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 2007;1:140–152.
- Schmelzle T, Mailleux AA, Overholtzer M et al. Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bim in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3787–3792.
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008;10:R25.
- Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* 2010;70:4260–4264.

34 Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: Signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:83–97.

35 Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857–868.

36 Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T et al. BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* 2007;12:221–234.

37 Muranen T, Selfors LM, Worster DT et al. Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive

resistance in matrix-attached cancer cells. *Cancer Cell* 2012;21:227–239.

38 Wang X, Belguise K, Kersual N et al. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol* 2007;9:470–478.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1. Involvement of the PI3K-AKT pathway in the maintenance of the stem cell profile of MCF7-Ras or MDA-MB-231 breast cells.

(A y B) MCF7-Ras cells (5×10^4) were seeded onto 6 cm plates (n=3) in different culture conditions, in the presence or absence of LY294002. The live cells were counted using trypan blue. The error bars represent the SD. In (B) representative phase-contrast brightfield images of the A. Scale Bars 50 μ m.

(C) Flow cytometry analysis of the proportion of cells exhibiting stem cell-like characteristics ($CD44^{\text{high}}/CD24^{\text{low}}$) after 7 days in *mammospheres* culture in the presence or absence of increasing concentrations of LY294002 in MDA-MB-231 cells.

(D) MDA-MB-231 cells were incubated in the presence of increasing concentrations of LY294002, and after 7 days in *mammospheres* culture, the treated and control cells were analyzed in Western blots probed with antibodies against pSer9/21GSK3, total-GSK3, β -catenin (shown at two exposure times), cyclin D1 and actin as a control of loading. Our data show a decrease in GSK3 phosphorylation, and a clear correlation between this activation of GSK3 and the concentration-dependent decrease in β -catenin and in cyclin D1 mediated by LY294002.

(E) Images of MDA-MB-231 cells growing as *mammospheres* after 7 days, immunostained with an antibody against β -catenin and with TO-PRO3 stained nuclei (in blue). Note that not only does the total β -catenin decrease (D) but its nuclear localization is prevented (E).

Figure S2. Efficiency and specificity of AKT shRNAs.

(A) MDA-MB-231 cells were transduced with the shcontrol, shAKT1 or shAKT2 lentiviral vectors. After 7 days growing as *mammospheres*, the cells were analyzed in Western blots probed with antibodies against total AKT, AKT1 and AKT2. Actin was assessed as a control of loading.

(B and C) Quantification of the generation of secondary spheres in the MDA-MB-231 cells transduced with a lentiviral vector for shcontrol and shAKT1, and these cells were subsequently grown as *mammospheres* in the presence or absence of LY294002 (LY 20 μ M) and Triciribine (Tri 10 μ M) for 7 days.

Figure S3. Knockdown of the AKT isoforms impaired proliferation.

MDA-MB-231 cells were transduced with the shAKT1, shAKT2, or shcontrol, lentiviral vectors and grown in *mammospheres* culture. The cells were incubated with the CFSE dye, as indicated in the Experimental Procedures and then they were maintained in *mammospheres* culture. Scale Bars 50 μ m.

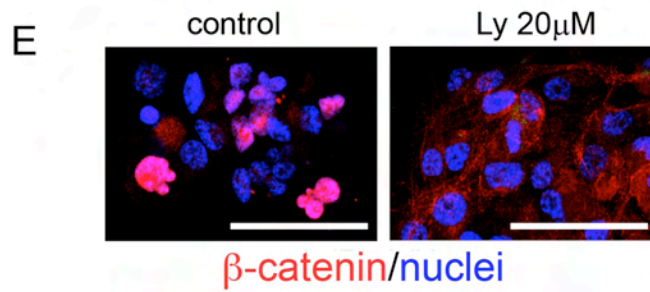
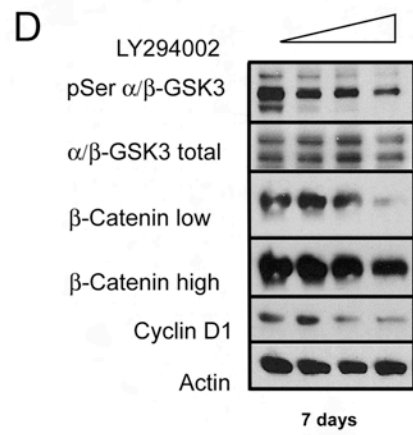
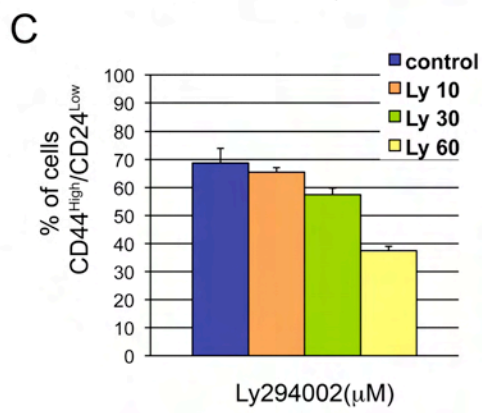
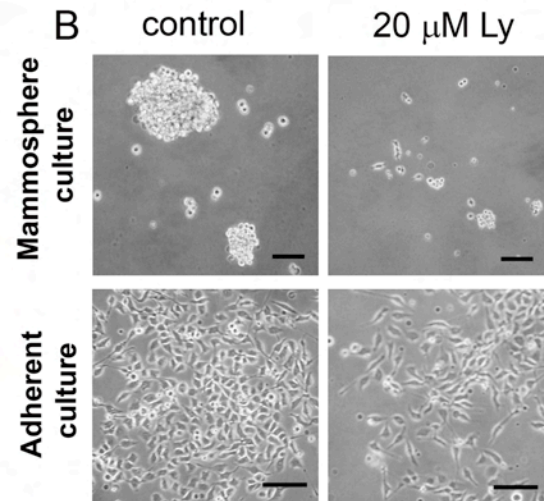
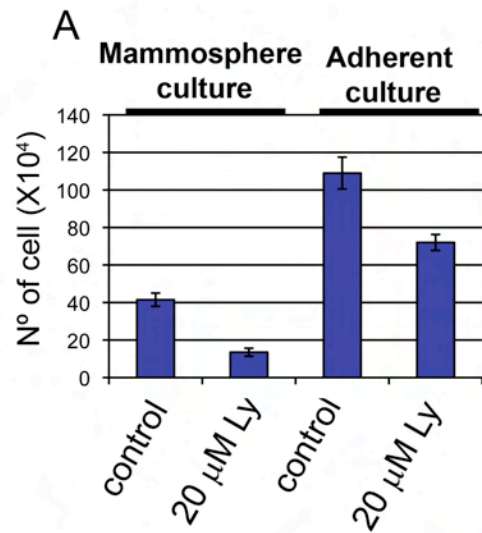
(A) Images of representative CFSE staining of MDA-MB-231 cells in each condition.

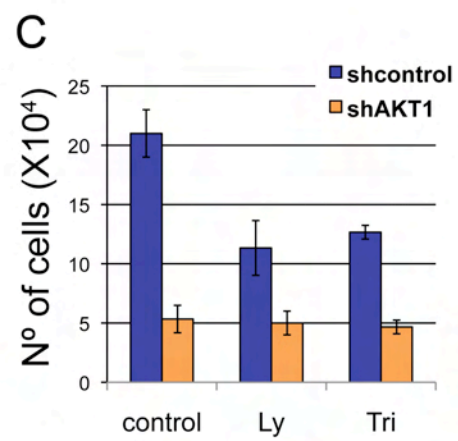
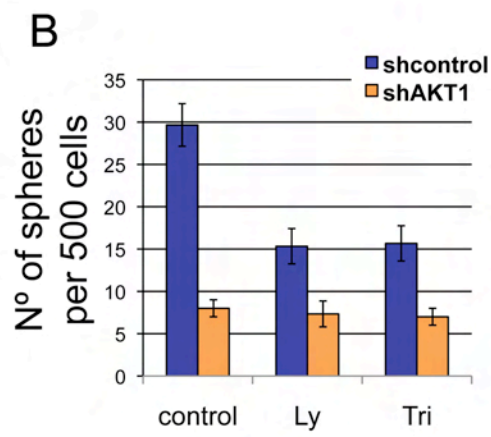
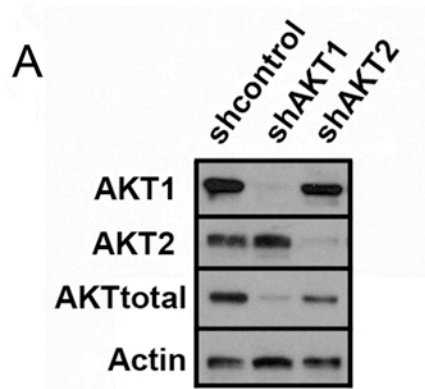
(B) After 7 days growing in *mammospheres* culture, these infected cells were analyzed by flow cytometry to determine their CFSE labelling, and the CD44 and CD24 profiles.

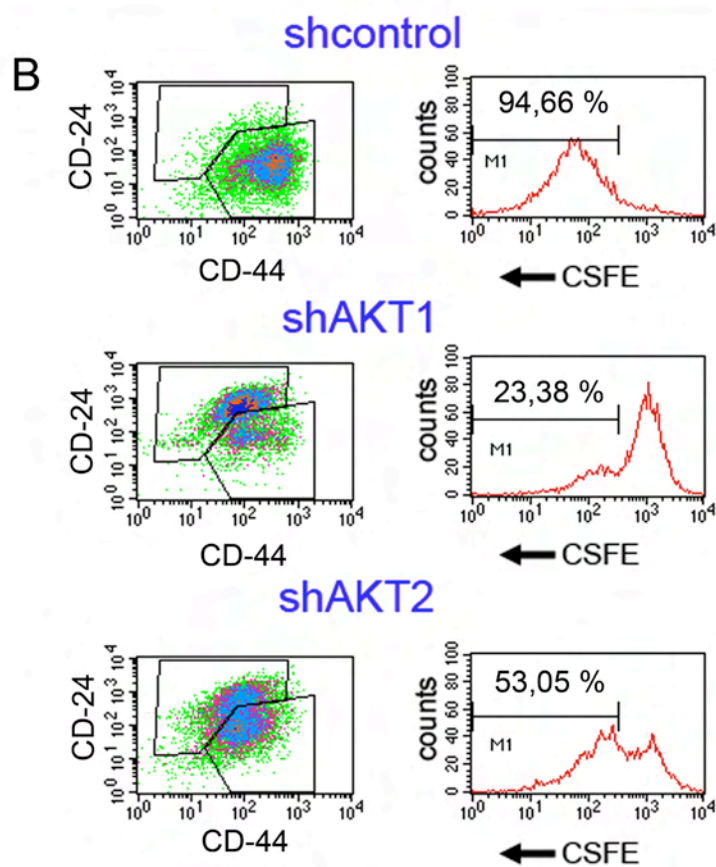
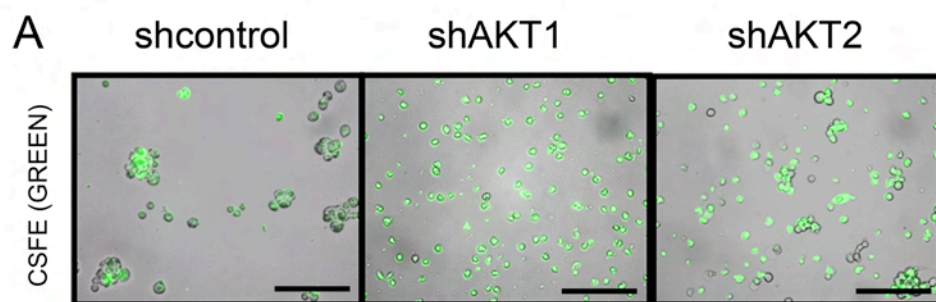
Only 23.38 % of the AKT1-KD cells progress through mitosis as opposed to 94.66% of the control cells.

Figure S4. Knockdown of AKT isoforms affects the Integrin β 1 levels in cells cultured in suspension.

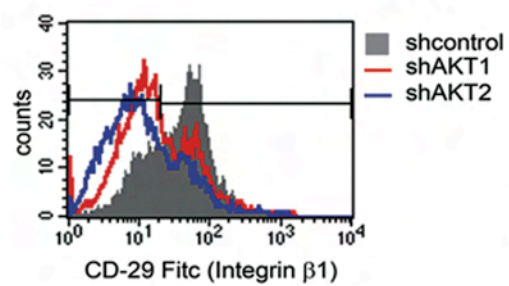
(A-B) MDA-MB-231 cells were traduced with shcontrol, shAKT1 or shAKT2 lentiviral vectors and they were grown for 7 days before they were analyzed by flow cytometry using the CD29 antibody that recognizes β 1-Integrin. The quantitative data from three different experiments are shown (B).







A



B

